

①

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 775 984**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

①⑫ N° d'enregistrement national : **98 02997**

①⑬ Int Cl⁶ : C 12 Q 1/68, C 12 N 15/10, 15/11, C 07 K 2/00, 16/18,
C 07 H 21/00

①⑭

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

①⑮ Date de dépôt : 11.03.98.

①⑯ Priorité :

①⑰ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 17.09.99 Bulletin 99/37.

①⑱ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

①⑲ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

①⑴ Demandeur(s) : BIOSCREEN THERAPEUTICS SA
Société anonyme — FR.

①⑵ Inventeur(s) : SCHWEIGHOFFER FABIEN,
BRACCO LAURENT et TOCQUE BRUNO.

①⑶ Titulaire(s) :

①⑷ Mandataire(s) : ERNEST GUTMANN YVES PLASSE-
RAUD SA.

①⑸ CRIBLAGE DIFFERENTIEL QUALITATIF.

①⑹ L'invention concerne un procédé d'identification et/ ou
de clonage de régions d'acides nucléiques épissées diffé-
rentiellement dans un échantillon biologique entre deux si-
tuations physiologiques, comprenant l'hybridation d'ARN
provenant de la situation test avec les ADNc provenant de
la situation de référence et l'identification et/ ou le clonage
d'acides nucléiques correspondant à des épissages diffé-
rentiels.

FR 2 775 984 - A1



Cette invention se rapporte aux domaines techniques de la biotechnologie, de la médecine, de la biologie et de la biochimie. Ses applications concernent les domaines de la santé humaine, animale et végétale. Plus particulièrement, l'invention permet d'identifier des séquences
5 d'acides nucléiques permettant de concevoir de nouveaux cribles pour molécules d'intérêt thérapeutique, de nouveaux outils de thérapie génique ainsi que d'apporter des indications sur le potentiel toxique de molécules et des informations de pharmacogénomique.

La présente invention décrit notamment une série de techniques
10 originales d'identification de séquences d'acides nucléiques basée sur la mise en évidence des différences qualitatives entre les ARN issus de deux contextes différents que l'on désire comparer, en particulier issus d'un tissu ou d'un organe malade et leur équivalent sain. Plus précisément, ces techniques sont destinées à cloner spécifiquement les introns et les exons
15 alternatifs épissés différemment entre une situation pathologique et un état sain ou entre deux situations physiologiques que l'on désire comparer.

La caractérisation des altérations de l'expression génétique qui président ou sont associées à une pathologie donnée suscite un espoir important de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux
20 outils diagnostiques. Toutefois, l'identification d'une séquence d'ADN génomique ou complémentaire, qu'elle ait lieu par clonage positionnel ou par des techniques de criblage différentiel quantitatif, n'apporte que peu ou pas d'information sur la fonction et encore moins sur les domaines fonctionnels mis en jeu dans les dérégulations liées à la pathologie étudiée. La présente
25 invention décrit une série de techniques originales qui visent à identifier les différences d'épissages qui existent entre deux situations physiopathologiques distinctes. L'identification de ces différences apporte des informations sur les différences qualitatives et non sur les différences quantitatives comme c'est le cas pour les techniques décrites jusqu'à
30 présent. L'ensemble des techniques présentées dans la présente invention sont donc regroupées sous l'appellation "criblage différentiel qualitatif". Les

méthodes de l'invention sont utilisables pour l'identification de nouvelles cibles ou produits thérapeutiques, pour la préparation d'outils de recherche génétique et/ou d'outils de diagnostic, pour la construction de banques d'acides nucléiques, et dans des méthodes de détermination du profil toxicologique ou de l'efficacité d'un composé par exemple.

Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans un procédé d'identification de régions d'acides nucléiques épissées différemment entre deux situations physiologiques, comprenant l'hybridation d'ARN provenant de la situation test avec les ADNc provenant de la situation de référence et l'identification d'acides nucléiques correspondant à des épissages différentiels.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de clonage d'acides nucléiques épissés différemment entre deux situations physiologiques, comprenant l'hybridation d'ARN provenant de la situation test avec les ADNc provenant de la situation de référence et le clonage d'acides nucléiques correspondant à des épissages différentiels.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre, le procédé d'identification et/ou de clonage d'acides nucléiques de l'invention comprend deux hybridations parallèles :

(a) l'hybridation d'ARN provenant de la situation test avec les ADNc provenant de la situation de référence;

(b) l'hybridation d'ARN provenant de la situation de référence avec les ADNc provenant de la situation test; et

(c) l'identification et/ou le clonage d'acides nucléiques correspondant à des épissages différentiels.

La présente invention concerne également la préparation de banques d'acides nucléiques, les acides nucléiques et banques ainsi obtenus, ainsi que les utilisations de ces matériels dans tous les domaines de la biologie/biotechnologie, comme illustré plus loin.

Comme indiqué ci-avant, la présente invention concerne en particulier des méthodes d'identification et de clonage d'acides nucléiques

représentatifs d'un état physiologique. En outre, les acides nucléiques identifiés et/ou clonés représentent les qualités d'un état physiologique en ce sens que ces acides nucléiques sont généralement en grande partie impliqués dans l'état physiologique observé. De ce fait, les méthodes
5 qualitatives de l'invention donnent accès directement aux éléments génétiques ou à leur produit protéique, ayant un rôle fonctionnel dans le développement d'un état physiopathologique.

Les méthodes selon l'invention reposent en partie sur une étape originale d'hybridation croisée entre des ARN et des ADNc de situations
10 physiologiques différentes. Cette ou ces hybridations croisées permettent avantageusement de mettre en évidence des régions non appariées, c'est-à-dire des régions présentes dans les ARN dans une situation physiologique donnée et pas dans les ARNs dans une autre situation physiologique. Ces régions correspondent essentiellement à des épissages alternatifs,
15 caractéristiques d'un état physiologique, et constituent ainsi des éléments génétiques particulièrement utiles sur le plan thérapeutique ou diagnostic comme expliqué ci-après.

L'invention concerne donc en premier lieu un procédé d'identification d'acides nucléiques d'intérêt comprenant l'hybridation entre les ARN d'un
20 échantillon test et les ADNc d'un échantillon de référence. Cette hybridation permet de mettre en évidence les différences d'épissage entre les situations testées, et en particulier les épissages caractéristiques de la situation test.

Selon une première variante de l'invention, le procédé permet donc de générer une population d'acides nucléiques caractéristiques des épissages
25 de l'état physiologique test par rapport à l'état de référence (Figure 1A). Comme indiqué ci-après, cette population peut être utilisée pour le clonage et la caractérisation des acides nucléiques, leur utilisation en diagnostic, criblage, thérapeutique ou pour la production d'anticorps ou de fragments protéiques ou de protéines entières. Cette population peut également servir
30 à la constitution de banques utilisables dans différents domaines d'applications illustrés plus loin (Figure 1C).

Selon une autre variante de l'invention, le procédé comprend une première hybridation telle que décrite ci-avant et une seconde hybridation, en parallèle, entre les ARN provenant de la situation de référence et les ADNc provenant de la situation test. Cette variante est particulièrement
5 avantageuse puisqu'elle permet de générer deux populations d'acides nucléiques, l'une représentant les qualités de la situation test par rapport à la situation de référence, et l'autre les qualités de la situation de référence par rapport à la situation test (Figure 1B). Ces deux populations peuvent également être utilisées comme source d'acides nucléiques, ainsi que
10 comme banques témoignant de l'empreinte génétique d'une situation physiologique donnée, comme détaillé plus loin (Figure 1C).

La présente invention peut être appliquée à tous types d'échantillons biologiques. En particulier, l'échantillon biologique peut être toute cellule, organe, tissu, prélèvement, biopsie, etc., contenant des acides nucléiques.
15 S'agissant d'un organe, tissu ou biopsie, ils sont éventuellement mis en culture de manière à permettre l'accès aux cellules qui les composent. Il peut s'agir d'échantillons provenant de mammifères (en particulier l'homme), de végétaux, de bactéries ou de cellules eucaryotes inférieures (levures, cellules fongiques, etc.). Des exemples de matériels sont en particulier une
20 biopsie de tumeur, une biopsie de plaques neurodégénératives ou d'aires cérébrales présentant des atteintes neurodégénératives, un échantillon de peau, un échantillon de cellules sanguines obtenues après prise de sang, une biopsie colorectale, des biopsies issues de lavages pulmonaires, etc. Des exemples de cellules sont notamment les cellules musculaires,
25 hépatiques, fibroblastes, nerveuses, de l'épiderme, du derme, des cellules sanguines comme les lymphocytes B, T, les mastocytes, les monocytes, les granulocytes, les macrophages.

Comme indiqué ci-avant, le criblage différentiel qualitatif selon la présente invention permet d'identifier des acides nucléiques caractéristiques
30 d'une situation physiologique donnée (situation B) par rapport à une situation physiologique de référence (situation A), en vue de leur clonage ou autres

utilisations. A titre illustratif, les situations physiologiques A et B étudiées peuvent être les suivantes :

SITUATION A	SITUATION B
échantillon sain	échantillon pathologique
échantillon sain	échantillon apoptotique
échantillon sain	échantillon après infection virale
échantillon sensible à X	échantillon résistant à X
échantillon non traité	échantillon traité (par exemple par composé toxique)
échantillon non différencié	échantillon ayant subi une différenciation cellulaire ou tissulaire

5 Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est possible d'utiliser des ARN totaux ou les ARN messagers. Ces ARN peuvent être préparés par toutes méthodes classiques de biologie moléculaire, bien connues de l'homme du métier. Ces méthodes comprennent généralement une lyse des cellules ou tissu ou échantillons et l'isolement des ARNs par
10 des techniques d'extraction. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium (qui détruit les cellules et protège les ARN) suivi d'une extraction des ARN au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynski et
15 al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156). Ces méthodes peuvent être aisément pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce tels que par exemple le kit US73750 (Amersham) pour les ARN totaux. Il n'est pas

nécessaire que les ARN utilisés soient parfaitement purs, et notamment il n'est pas gênant que des traces d'ADN génomique ou d'autres composants cellulaires (protéine, etc.) subsistent dans les préparations, dès lors qu'ils n'affectent pas significativement la stabilité des ARNs. En outre, de manière facultative, il est possible d'utiliser non pas des préparations d'ARN totaux mais des préparations d'ARN messagers. Ceux-ci peuvent être isolés, soit directement à partir de l'échantillon biologique soit à partir des ARN totaux, au moyen de séquences polyT, selon les méthodes classiques. L'obtention d'ARN messagers peut à cet égard être réalisée au moyen de kits commerciaux tels que par exemple le kit US72700 (Amersham). Les ARN peuvent également être obtenus directement à partir de banques ou autres échantillons préparés à l'avance et/ou accessibles dans des collections, conservés dans des conditions appropriées.

Généralement, les préparations d'ARN utilisées comprennent avantagusement au moins 0,1 µg d'ARN, de préférence au moins 0,5 µg d'ARN. Les quantités peuvent varier selon les cellules et les méthodes utilisées, sans modifier la mise en oeuvre de la présente invention. Pour obtenir des quantités d'ARN suffisantes (de préférence 0,1 µg au moins), il est généralement recommandé d'utiliser un échantillon biologique comprenant au moins 10^5 cellules. A cet égard, une biopsie classique comprend généralement entre 10^5 et 10^8 cellules, et une culture cellulaire sur boîte de pétri classique (diamètre 6-10 cm) comporte de l'ordre de 10^6 cellules, ce qui permet d'obtenir aisément des quantités d'ARN suffisantes.

Les préparations d'ARN peuvent être utilisées extemporanément ou être conservées, de préférence au froid, en solution ou congelées, pour des utilisations ultérieures.

Les ADNc utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être obtenus par transcription inverse selon les techniques classiques de biologie moléculaire. On peut se référer notamment à Maniatis et al. La transcription inverse est généralement réalisée en utilisant une enzyme, transcriptase inverse ("reverse transcriptase") et une amorce.

A cet égard, de nombreuses transcriptases inverses ont été décrites dans la littérature et sont disponibles dans le commerce (Kit 1483188, Boehringer). On peut citer à titre d'exemples les transcriptases inverses les plus souvent utilisées comme celles du virus aviaire AMV (Avian Myeloblastosis Virus) et du virus de leucémie murine MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Il convient également de citer certaines DNA polymérase thermostables douées d'activité transcriptase inverse telles celles isolées de *Thermus flavus* et de *Thermus thermophilus* HB-8 (commerciallement disponibles ; références Promega M1941 et M2101). On utilise
10 avantageusement pour la mise en oeuvre de la présente invention la transcriptase inverse d'AMV puisque cette enzyme, fonctionnant à 42°C (contrairement à celle de MMLV qui fonctionne à 37°C), déstabilise certaines structures secondaires des ARN qui pourraient bloquer l'élongation, et permet ainsi la transcription inverse d'ARN de longueur importante, et permet
15 d'avoir des préparations d'ADNc représentant les ARN avec une grande fidélité et une grande efficacité. Les conditions de mise en oeuvre de ces enzymes (concentration et température) sont bien connues de l'homme du métier. En particulier, on utilise généralement de 10 à 30 Unités d'enzyme par réaction, en présence d'une concentration optimale en Mg^{2+} de 10 mM.

20 La ou les amorces utilisées pour la transcription inverse peuvent être de natures différentes. Il peut s'agir en particulier d'un oligonucléotide aléatoire ("random") comprenant de préférence entre 4 et 10 nucléotides, avantageusement un hexanucléotide. L'utilisation de ce type d'amorce aléatoire a été décrite dans la littérature et permet d'initier la transcription
25 inverse en différentes positions au hasard au sein des molécules d'ARN. Cette technique est surtout employée pour la transcription inverse d'ARN totaux (c'est-à-dire comprenant les ARNm, les ARNt et les ARNr notamment). Dans le cas où l'on souhaite réaliser la transcription inverse des ARNm seulement, il est avantageux d'utiliser comme amorce un
30 oligonucléotide oligo dT, qui permet d'initier la transcription inverse à partir des queues polyA spécifiques des ARN messagers. L'oligonucléotide oligo

dT peut comprendre de 4 à 20-mères, avantageusement de 15-mères environ. L'emploi de ce type d'amorce constitue un mode de réalisation préféré de l'invention. D'autre part, il peut être avantageux d'utiliser pour la transcription inverse une amorce marquée. Ceci peut en effet permettre de
5 reconnaître et/ou de sélectionner et/ou de trier ultérieurement les ARN des ADNc. Ceci peut également permettre d'isoler les hétéroduplex ARN/ADN dont la formation représente une étape clef de l'invention. Le marquage de l'amorce peut consister en tout système de type ligand-récepteur, c'est-à-dire permettant par affinité de séparer les molécules portant l'amorce. Il peut
10 s'agir par exemple d'un marquage par la biotine, qui peut être séparé par tout support (bille, colonne, plaques, etc.) sur lequel est fixée la streptavidine. Tout autre système de marquage permettant cette séparation sans affecter les propriétés d'amorce peut être utilisé de manière équivalente.

Dans les conditions habituelles de mise en oeuvre, cette transcription
15 inverse génère des ADN complémentaires (ADNc) simple-brins. Ceci constitue un premier mode avantageux de la présente invention.

Dans une deuxième variante de mise en oeuvre, la transcription inverse est réalisée de manière à préparer des ADNc double-brins. Pour ce faire, après transcription du premier brin d'ADNc, le deuxième brin peut être
20 généré selon les techniques classiques de biologie moléculaire faisant intervenir des enzymes de modification de l'ADN comme l'ADN polymérase I et l'ADN polymérase du phage T4.

Les préparations d'ADNc peuvent être utilisées extemporanément ou être conservées, de préférence au froid, en solution ou congelées, pour des
25 utilisations ultérieures.

Comme expliqué ci-avant, les méthodes selon l'invention reposent en partie sur une étape originale d'hybridation croisée entre des ARN et des ADNc de situations physiologiques différentes. Dans un mode de réalisation préféré, l'hybridation selon l'invention est avantageusement réalisée en
30 phase liquide. En outre, elle peut être effectuée dans tout dispositif approprié, tel que par exemple des tubes (Eppendorff, par exemple), des

plaques, ou tout autre support adapté et couramment utilisé en Biologie Moléculaire. L'hybridation est avantageusement réalisée dans des volumes compris entre 10 et 1000 μ l, par exemple entre 10 et 500 μ l. Il est entendu que le dispositif utilisé et les volumes utilisés peuvent être aisément adaptés
5 par l'homme du métier. Les quantités d'acides nucléiques utilisées pour l'hybridation sont également connues de l'homme du métier. En général, il est suffisant d'utiliser des microgrammes d'acides nucléiques, par exemple de l'ordre de 0,1 à 100 μ g.

Un élément plus important dans la mise en oeuvre des hybridations
10 réside dans les quantités respectives d'acides nucléiques utilisées. Ainsi, il est possible d'utiliser les acides nucléiques dans un rapport ADNc/ARN variant de 50 à 0,02 environ, de préférence de 40 à 0,1. De manière plus particulièrement avantageuse, on préfère que le rapport ADNc/ARN soit proche ou supérieur à 1. En effet, dans ces expériences, l'ARN constitue le
15 composé test ("tester") et l'ADNc constitue le porteur ("driver"). De ce fait, dans le but d'améliorer la spécificité de la méthode, il est préférable d'opérer dans des conditions où le "driver" se trouve en excès par rapport au "tester". En effet, dans ces conditions, l'effet de coopérativité entre les acides nucléiques joue et les appariements non-parfaits sont fortement défavorisés.
20 De ce fait, les seuls mésappariements qui apparaissent sont généralement dus à la présence de régions dans les ARN "tester" qui n'existent pas dans l'ADNc "driver" et qui sont donc spécifiques. Pour favoriser la spécificité du procédé, l'hybridation est donc avantageusement réalisée à un rapport ADNc/ARN compris entre 1 environ et 10 environ. Il est bien entendu que ce
25 rapport peut être adapté par l'homme du métier selon les conditions du procédé (quantités d'acides nucléiques disponibles, situations physiologiques, but poursuivi, etc.). Les autres paramètres de l'hybridation (temps, température, force ionique) sont également adaptables par l'homme du métier. De manière générale après dénaturation des "tester" et "driver"
30 (par chauffage par exemple), l'hybridation est réalisée pendant environ 2 à 24 heures, à une température de 37°C environ (éventuellement soumise à

des sauts de température comme décrit plus loin), et dans des conditions standard de force ionique (pouvant varier de 0,1 à 5M NaCl par exemple). Il est connu que la force ionique est un des facteurs déterminant la stringence d'une hybridation, notamment dans le cas d'hybridation sur support solide.

5 Selon un mode de mise en oeuvre particulier de l'invention, l'hybridation est réalisée en émulsion phénolique, par exemple selon la technique PERT ("Phenol Emulsion DNA Reassociation Technique) décrite par Kohne D.E. et al. (Biochemistry, Vol. 16, N° 24, pp 5329-5341, 1977). Avantageusement, on utilise dans le cadre de la présente invention
10 l'hybridation en émulsion phénolique maintenue par thermocycles (sauts de température de 37°C environ à 60/65°C environ) et non par agitation, selon la technique décrite par Miller et Riblet (NAR 23 (1995) 2339). Toute autre technique d'hybridation en phase liquide, de préférence en émulsion, peut être utilisée dans le cadre de la présente invention.

15 L'hybridation peut également se faire avec l'un des partenaires immobilisé sur un support. Avantageusement, c'est l'ADNc qui est immobilisé. Cela peut être réalisé en tirant profit du marquage dont peuvent faire l'objet les ADNc (voir ci-dessus) notamment grâce à des amorces biotinylées. Les groupements biotine sont mis en présence de billes
20 magnétiques sur lesquelles sont fixées des molécules de streptavidine. Les ADNc peuvent ensuite être maintenus grâce à un aimant au contact d'un filtre ou d'un puits de plaque de microtitration. Les ARN sont ensuite, dans les conditions de force unique requise, mis en présence des ADNc. Les ARN non appariés sont éliminés par lavage. Les ARN hybridés ainsi que les ADNc
25 sont récupérés par retrait du champ magnétique.

Dans le cas où l'ADNc est double-brin, les conditions d'hybridation utilisées sont essentiellement similaires à celles décrites ci-dessus, et adaptables par l'homme du métier. On préfère dans ce cas procéder à l'hybridation en présence de formamide. De plus, il est souhaitable d'ajouter,
30 après l'hybridation, un agent de stabilisation des triplex formés, tels que le glyoxal par exemple.

Ces hybridations croisées selon l'invention génèrent ainsi des compositions comprenant des hétéroduplex ou hétérotriplex ADNc/ARN, représentant les qualités de chacune des situations physiologiques testées. Comme indiqué ci-avant, dans chacune de ces compositions, des acides nucléiques correspondant essentiellement à des épissages alternatifs
5 différentiels, spécifiques de chaque situation physiologique, peuvent être identifiés et/ou clonés.

L'invention concerne donc avantageusement un procédé d'identification et/ou de clonage de régions d'acides nucléiques épissées
10 différemment dans un échantillon biologique entre deux situations physiologiques, comprenant l'hybridation d'ARN provenant de la situation test avec les ADNc simple-brins provenant de la situation de référence, et l'identification des régions d'ARN non-appariées.

Cette première variante repose plus particulièrement sur la formation
15 d'hétéroduplex entre les ARN et les ADNc simple-brin (voir Figures 2-4). Cette variante est avantageusement mise en oeuvre en utilisant des ARN messagers ou des ADNc produits par transcription inverse des ARN messagers essentiellement, c'est-à-dire en présence d'une amorce oligo dT.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre, le procédé
20 d'identification et/ou de clonage d'acides nucléiques de l'invention comprend :

- (a) l'hybridation d'ARN provenant de la situation test avec les ADNc simple-brin provenant de la situation de référence;
- (b) l'hybridation d'ARN provenant de la situation de référence avec les
25 ADNc simple-brin provenant de la situation test; et
- (c) l'identification et/ou le clonage de régions d'ARN non-appariées.

Dans une variante particulière de mise en oeuvre, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

- (a) l'obtention d'ARN à partir d'un échantillon biologique dans une
30 situation physiologique A (rA);
- (b) l'obtention d'ARN à partir d'un même échantillon biologique dans

une situation physiologique B (rB);

(c) la préparation d'ADNc à partir d'une partie des ARN rA obtenus en (a) (ADN cA) et à partir d'une partie des ARN rB obtenus en (b) (ADN cB) au moyen d'amorces polyT,

5 (d) l'hybridation en phase liquide d'une partie des ARN rA avec une partie des ADN cB (pour générer des hétéroduplex rA/cB)

(e) l'hybridation en phase liquide d'une partie des ARN rB avec une partie des ADN cA (pour générer des hétéroduplex rB/cA),

(f) l'identification et/ou le clonage de régions d'ARN non appariées
10 dans les hétéroduplex rA/cB et rB/cA obtenus en (d) et en (e).

Dans une autre variante particulière de mise en oeuvre, le procédé de l'invention comprend l'hybridation d'ARN provenant de la situation test avec les ADNc double-brins provenant de la situation de référence, et l'identification et/ou le clonage des régions d'ADN double-brin formées. Cette
15 deuxième variante repose plus particulièrement sur la formation d'hétérotriplex entre les ARN et les ADNc double-brin (voir Figure 5). Cette variante est également préférentiellement mise en oeuvre en utilisant des ARN messagers ou des ADNc produits par transcription inverse des ARN messagers essentiellement, c'est-à-dire en présence d'une amorce polyT.
20 Dans cette variante également, un mode de réalisation particulier comprend deux hybridations parallèles, générant deux populations d'acides nucléiques selon l'invention. Dans cette variante, les régions recherchées, spécifiques des épissages alternatifs, ne sont pas les régions d'ARN non appariées, mais des ADN double-brins (voir Figure 5).

25 A partir des populations d'acides nucléiques générées par hybridation, les régions caractéristiques des épissages alternatifs différentiels peuvent être identifiées par toute technique connue de l'homme du métier.

Ainsi, dans le cas des hétéroduplex ARN/ADN (première variante du procédé), ces régions se présentent essentiellement sous forme de régions
30 d'ARN non-appariées (boucles d'ARN), comme représenté sur la Figure 3. Ces régions peuvent donc être identifiées et clonées par séparation des

hétéroduplex et des acides nucléiques simple-brin (excès d'acide nucléique n'ayant pas réagi), digestion sélective des ARN double-brins (domaines engagés dans les hétéroduplex), puis séparation des ARN simple-brin résultant et des ADN simple-brins.

5 A cet égard, selon une première approche illustrée sur la Figure 3, les régions d'ARN non appariées sont identifiées par traitement des hétéroduplex au moyen d'une enzyme capable de digérer sélectivement les domaines des ARN engagés dans des hétéroduplex ARN/ADN. Des enzymes douées de cette propriété sont décrites dans l'art antérieur et sont
10 disponibles dans le commerce. Ce sont les RNases H, telles que en particulier, celle de E. Coli produite sous forme recombinante et disponible dans le commerce (Promega Réf. M4281 ; Life Technologies Réf. 18021). Ce premier traitement génère donc un mélange comprenant les régions d'ARN non appariées simple-brin et les ADNc simple-brin. Les ARNs peuvent
15 être séparés des ADNc par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment sur la base du marquage des amorces utilisées pour la préparation des ADNc (voir ci-dessus). Ces ARN peuvent être utilisés comme source de matériel pour l'identification de cibles, de produits génétiques d'intérêt ou toute autre application. Ces ARN peuvent également
20 être convertis en ADNc, puis clonés dans des vecteurs, comme décrit ci-après.

 A cet égard, le clonage des ARNs peut être réalisés de différentes façons. L'une consiste à insérer à chaque extrémité des ARN des oligonucléotides servant de matrice à une réaction de transcription inverse
25 en présence des amorces correspondantes. Cet ajout d'amorces se fait selon les techniques bien connues de l'homme du métier grâce à une enzyme, telle que par exemple la ARN ligase qui provient du phage T4 et qui catalyse la formation de liaisons phosphodiester intermoléculaires entre le phosphate en 5' d'une molécule donneuse et l'hydroxyl en 3' d'une molécule
30 acceptrice. Une telle ARN ligase est disponible commercialement (par exemple Life Technologies - GIBCO BRL Réf. 18003). Les ADNc ainsi

obtenus peuvent ensuite être amplifiés par les techniques classiques (PCR par exemple) en utilisant les amorces appropriées, comme illustré sur la Figure 3 et dans les exemples. Cette technique est particulièrement adaptée au clonage des ARN de petite taille (inférieure à 1000 b).

5 L'autre approche pour le clonage et/ou l'identification des régions d'ARN spécifiques consiste par exemple à réaliser une transcription inverse, soit sur les hétéroduplex générés directement par hybridation, soit sur le produit de digestion par une enzyme spécifique des ARN double-brin, en utilisant des amorces aléatoires, qui vont initier la transcription au hasard à
10 l'intérieur des ARNs. Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, par exemple par PCR en utilisant des amorces grâce à des oligonucléotides ajoutés aux extrémités des ADNc grâce à l'action de l'ADN ligase du phage T4 (disponible commercialement ; par exemple chez Life Technologies - GIBCO BRL ref.
15 15224). Cette seconde technique est illustrée sur la Figure 4 et dans les exemples. Cette technique est plus particulièrement adaptée aux ARNs de taille importante, et permet d'obtenir une partie de l'information de séquence, suffisante pour reconstituer par la suite la totalité de la séquence de départ.

Généralement, l'étape d'identification et/ou de clonage des ARN met
20 en oeuvre ces deux méthodes, de manière à obtenir l'information la plus complète.

Dans le cas des hétérotripleux (autre variante du procédé), ces régions d'épissages différentiels se présentent essentiellement sous forme de régions d'ADN double-brin, comme représenté sur la Figure 5. Ces régions
25 peuvent donc être identifiées et clonées par traitement en présence d'enzymes appropriées telles qu'une enzyme permettant de digérer les ARN, puis une enzyme permettant de digérer les ADN simple-brin. Les acides nucléiques ainsi obtenus sont donc directement sous forme d'ADN double-brin et peut être clonés dans tout vecteur approprié.

30 Les vecteurs utilisés dans l'invention peuvent être notamment des plasmides, cosmides, phages, YAC, HAC, etc. Ces acides nucléiques

peuvent ainsi être conservés tels quels, ou introduits dans des microorganismes adaptés au vecteur de clonage utilisé, afin d'être multipliés et/ou conservés sous forme de cultures.

Les méthodes telles que décrites ci-dessus sont généralement mises
5 en oeuvre, pour chaque échantillon, sur une période de temps de moins de deux mois, en particulier moins de 6 semaines. Par ailleurs, ces différentes méthodes peuvent être automatisées afin de réduire la durée totale et de faciliter le traitement de nombreux échantillons.

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne les acides
10 nucléiques identifiés et/ou clonés par les méthodes de l'invention. Comme indiqué ci-dessus, ces acides nucléiques peuvent être des ARN ou des ADNc. Plus généralement, l'invention concerne une composition d'acides nucléiques, comprenant essentiellement des acides nucléiques correspondant aux épissages alternatifs distinguant deux situations
15 physiologiques. Plus particulièrement, ces acides nucléiques correspondent aux épissages alternatifs identifiés dans un échantillon biologique test et non présents dans le même échantillon biologique dans une situation de référence. L'invention a également pour objet l'utilisation des acides nucléiques ainsi clonés comme produit thérapeutique ou diagnostic, ou
20 comme outil de criblage de molécules actives, comme indiqué ci-après.

Les différentes méthodes exposées ci-dessus aboutissent donc toutes au clonage de séquences d'ADNc qui représentent l'information génétique épissée différenciellement entre deux situations physiopathologiques. L'ensemble des clones issus de l'une de ces méthodes permet donc la
25 constitution d'une banque représentative des différences qualitatives qui existent entre deux situations étudiées.

A cet égard, l'invention concerne en outre un procédé de préparation d'une banque d'acides nucléiques représentatifs d'un état physiologique donné d'un échantillon biologique. Ce procédé comprend avantageusement
30 le clonage d'acides nucléiques représentatifs des épissages alternatifs dudit état physiologique et non présents dans un état de référence, dans des

banques spécifiques de différences qualitatives qui existent entre les 2 états étudiés.

Ces banques sont constituées d'ADNc insérés dans des vecteurs plasmidiques ou phagiques. Ces banques peuvent être présentées sur des
5 filtres de nitrocellulose ou tout autre support connu de l'homme de l'art, tels des chips ou biopuces.

L'une des caractéristiques et en même temps l'une des originalités du criblage différentiel qualitatif est que cette technique aboutit à non pas une
mais avantageusement deux banques différentielles qui représentent
10 l'ensemble des différences qualitatives qui existent entre deux situations données : Paire de banque (voir figure 1C).

Le choix des ARN de départ va fixer en partie les caractéristiques des banques obtenues :

- les ARN des deux situations A et B sont des ARNm ou des ARN
15 totaux matures isolés selon les techniques connues de l'homme de l'art. Les banques sont alors des banques de criblage différentiel qualitatif dites restreintes, car restreintes aux différences qualitatives qui caractérisent les ARN matures des deux situations physiopathologiques.

- Les ARN de l'une des situations sont des ARNm ou totaux matures
20 alors que les ARN de l'autre situation sont des ARN pré-messagers, non maturés par épissage, isolés selon les techniques connues de l'homme de l'art, à partir de noyaux cellulaires. Dans ce cas les banques obtenues sont des banques de criblage différentiel dites complexes, puisque non restreintes aux différences entre ARN matures mais comprenant tout le répertoire des
25 épissages transcrits dans une situation et éliminés dans l'autre, dont tous les introns.

- enfin, les ARN peuvent provenir d'une seule situation physiopathologique et dans ce cas le criblage différentiel implique les ARN matures et les pré-messagers d'un même échantillon. Dans ce cas, les
30 banques obtenues sont des banques de criblage différentiel qualitatif autologues. L'intérêt de telles banques est qu'elles rassemblent

exclusivement le répertoire des introns transcrits dans une situation donnée. Leur hybridation avec une sonde provenant d'ARN matures d'une autre situation détermine rapidement si à cette situation est caractérisée par une rétention d'introns tout en permettant aisément leur identification.

5 Préférentiellement, la banque est réalisée par hybridation croisée entre les ARN provenant de l'état physiologique test avec les ADNc provenant de l'état physiologique de référence et sélection des acides nucléiques d'intérêt dans les conditions décrites ci-avant. En outre, après constitution de telles banques, il est possible d'effectuer une étape de
10 sélection des clones pour améliorer la spécificité des banques obtenues. En effet, il est possible que certains mésappariements observés ne soient pas uniquement dus à des épissages alternatifs différentiels, mais puissent résulter de défaut(s) de la transcription inverse par exemple. Bien que ces événements ne soient pas généralement significatifs, il est préférable de les
15 éliminer ou de les réduire préalablement au clonage des acides nucléiques. Pour ce faire, les clones de la banque peuvent être hybridés avec les populations d'ADNc des deux situations physiologiques étudiées (voir étape (c) ci-dessus). Les clones hybridant avec les deux populations peuvent être considérés comme non-spécifiques et éventuellement éliminés. Les clones
20 n'hybridant qu'avec une seule des deux populations sont considérés comme spécifiques et peuvent être sélectionnés pour constituer des banques enrichies ou affinées.

Un affinage peut également être réalisé par hybridation et validation de clones avec des sondes provenant d'un nombre statistiquement relevant
25 d'échantillons pathologiques.

La présente demande a également pour objet toute banque d'acides nucléiques comprenant des acides nucléiques spécifiques d'épissages alternatifs caractéristiques d'une situation physiologique. Ces banques sont avantageusement constituées d'ADNc, généralement double-brin,
30 correspondant aux régions d'ARN spécifiques d'un épissage alternatif. Ces banques peuvent être constituées des acides nucléiques, généralement

dans un vecteur de clonage, ou de cultures cellulaires contenant lesdits acides nucléiques. L'invention concerne donc aussi des banques de microorganismes transformés par des acides nucléiques spécifiques d'épissages alternatifs distinguant deux situations physiologiques d'une
5 cellule ou d'un tissu.

Généralement, les banques sont générées par étalement, sur milieu solide (notamment sur milieu gélosé), d'une culture cellulaire transformée par les acides nucléiques clonés. La transformation est réalisée par toute technique connue de l'homme du métier (transfection, phosphate de calcium,
10 électroporation, infection par des bactériophages, etc). La culture cellulaire est généralement une culture de bactéries, telles que par exemple les bactéries E. coli. Il peut également s'agir de cultures de cellules eucaryotes, notamment de cellules eucaryotes inférieures (levures par exemple). Cet étalement peut être réalisé sur boîte ou sur tout autre support adapté, en conditions stériles. En outre,
15 ces cultures étalées en milieu gélosé peuvent être stockées sous forme congelée par exemple (dans du glycérol ou autre agent adapté). Ces banques peuvent naturellement être utilisées pour la production de "répliques", c'est-à-dire de copies selon les techniques habituelles détaillées ci-après. En outre, ces banques servent généralement à préparer une banque amplifiée, c'est-à-dire une banque
20 comprenant chaque clone sous forme amplifiée. Une banque amplifiée est préparée comme suit : à partir de la culture étalée, tous les clones cellulaires sont récupérés et sont conditionnés pour être conservés sous forme congelée ou au froid, dans tout milieu adapté. Cette banque amplifiée est avantageusement réalisée à partir de cultures de bactéries E.coli, et conservée à 4°C, en conditions stériles. Cette
25 banque amplifiée permet la préparation et la reproduction illimitée de toute banque ultérieure contenant ces clones, sur différents supports, pour différentes applications. Une telle banque permet en outre l'isolement et la caractérisation de tout clone d'intérêt. Chacun des clones constituant les banques de l'invention est en effet un élément caractéristique d'une situation physiologique, et constitue
30 donc une cible particulièrement intéressante pour différentes études telles que la recherche de marqueurs, la préparation d'anticorps, le diagnostic, le traitement pour transfert de gènes, etc. Ces différentes applications sont

discutées plus en détail plus loin. La banque est généralement préparée comme décrit ci-dessus par étalement des cultures dans un milieu gélosé, sur un support adapté (boite de pétri par exemple). L'intérêt d'utiliser un milieu gélosé est que chaque colonie peut être séparée et individualisée. A
5 partir de cette culture, des répliques à l'identique peuvent être préparées en quantités importantes par simple "réplique" sur tout support approprié selon les techniques de l'homme de l'art. Ainsi, la réplique peut être réalisée au moyen de filtres, membranes (nylon, nitrocellulose, etc) permettant l'accrochage des cultures. Les filtres peuvent ensuite être stockés en l'état, à
10 4°C par exemple, sous forme desséchée, dans tout type de conditionnement qui n'altère pas les acides nucléiques. Les filtres peuvent également être traités de manière à éliminer les cellules, protéines, etc, et à ne conserver que des composants tels que les acides nucléiques. Ces traitement peuvent comprendre notamment des protéases, des détergents, etc. Les filtres traités
15 peuvent également être conservés dans tout dispositif ou toute condition adaptés aux acides nucléiques.

Les banques d'acides nucléiques peuvent également être préparées directement à partir des acides nucléiques, par dépôt sur des biopuces ou tout autre dispositif approprié.

20 L'invention concerne donc également tout support (membrane, filtre, biopuce, chip, etc) comprenant une banque telle que définie ci-dessus. Il peut s'agir plus particulièrement d'une banque cellulaire ou d'une banque d'acides nucléiques. L'invention concerne également tout kit ou support comprenant plusieurs banques selon l'invention. En particulier, il peut être
25 avantageux d'utiliser en parallèle une banque représentative des qualités d'un état physiologique test par rapport à un état physiologique de référence et, à titre de contrôle, une banque représentative des qualités de l'état physiologique de référence par rapport à l'état physiologique test ("paire de banques"). Un kit avantageux selon l'invention comprend donc deux banques
30 qualitatives différentielles de deux situations physiologiques (une "paire de banques"). Selon un mode de réalisation particulier, les kits de l'invention

comprennent plusieurs paires de banques telles que définies ci-dessus, correspondant à différents états physiologiques ou à différents échantillons biologiques par exemple. Les kits peuvent comprendre par exemple ces différentes paires de banques déposées en série sur un même support.

5 L'invention concerne également toute banque comprenant des oligonucléotides spécifiques d'épissages alternatifs distinguant deux situations physiologiques. Il s'agit avantageusement d'oligonucléotides simple-brin, comprenant de 5 à 100-mères, de préférence moins de 50-mères, par exemple autour de 25-mères environ.

10 Ces oligonucléotides sont spécifiques d'épissages alternatifs représentatifs d'une situation ou d'un type de situation physiologique. Ainsi, de tels oligonucléotides peuvent être par exemple des oligonucléotides représentatifs d'événements d'épissages alternatifs caractéristiques de situations d'apoptose. Il a en effet été décrit dans la littérature que certains
15 épissages alternatifs étaient observés dans le cadre de situations apoptotiques. Il s'agit par exemple d'épissages dans les gènes Bclx, Bax, Fas ou Grb2 notamment. A partir des données publiées et des séquences accessibles dans la littérature et/ou sur bases de données, il est possible de créer des oligonucléotides spécifiques des formes épissées et non épissées.
20 Ces oligonucléotides peuvent par exemple être créés selon la stratégie suivante :

(a) identification d'une protéine ou d'un événement d'épissage caractéristique d'une situation d'apoptose et de la séquence du domaine épissé. Cette identification peut être basée sur des données publiées ou par
25 compilation de séquences accessibles sur bases de données;

(b) synthèse artificielle d'un ou plusieurs oligonucléotides correspondant à une ou plusieurs régions de ce domaine, qui permettent donc par hybridation de mettre en évidence la forme non épissée dans les ARN d'un échantillon test;

30 (c) synthèse artificielle d'un ou plusieurs oligonucléotides correspondant à la région de jonction entre les deux domaines séparés par

le domaine épissé. Ces oligonucléotides permettent donc par hybridation de mettre en évidence la forme épissée dans les ARN d'un échantillon test;

(d) reproduction des étapes (a) à (c) ci-dessus avec d'autres protéines ou événements d'épissages caractéristiques d'une situation d'apoptose;

5 (e) transfert sur un premier support approprié du ou des oligonucléotides spécifiques des formes apoptotiques des messagers identifiés ci-avant et, sur un autre support approprié, du ou des oligonucléotides spécifiques des formes non-apoptotiques.

Les deux supports ainsi obtenus peuvent être utilisés pour tester l'état
10 physiologique de cellules ou échantillons tests, et notamment leur état apoptotique, par hybridation d'une préparation d'acides nucléiques de ces cellules ou échantillons.

D'autres banques similaires peuvent être générées avec des oligonucléotides spécifiques d'états physiopathologiques différents
15 (neurodégénérescence, toxicité, prolifération, etc.) et ainsi permettre un élargissement des domaines d'applications. Des banques d'introns ou d'exons alternatifs peuvent aussi être des banques de données informatiques constituées par analyse systématique des banques de données qui regroupent les informations relatives au génome de tel ou tel organisme,
20 tissu ou culture cellulaire. Dans ce cas, les données obtenues par constitution de telles banques virtuelles peuvent être utilisées pour générer des amorces oligonucléotidiques qui seront utilisées pour tester en parallèle deux situations physiopathologiques.

Les données des banques informatiques peuvent également être
25 utilisées pour dériver des sondes nucléotidiques générales, représentatives d'une classe de protéines ou encore spécifiques d'une séquence définie. Ces sondes peuvent ensuite être appliquées sur les banques de clones issues des différentes techniques de clonage des introns et exons alternatifs afin d'obtenir une image de la complexité de ces banques moléculaires et de
30 déterminer rapidement si telle ou telle classe de protéines ou telle ou telle séquence déterminée est épissée différemment entre deux états

physiopathologiques distincts.

Les méthodes de l'invention permettent ainsi l'identification systématique de différences qualitatives d'expression génique. Ces méthodes présentent de nombreuses applications, dans l'identification et/ou
5 le clonage de molécules d'intérêt, en toxicologie, en pharmacologie ou encore en pharmacogénomique par exemple.

L'invention concerne donc également l'utilisation des méthodes, acides nucléiques ou banques décrits ci-dessus pour l'identification de molécules d'intérêt thérapeutique ou diagnostique. L'invention concerne plus
10 particulièrement l'utilisation des méthodes, acides nucléiques ou banques décrits ci-dessus pour l'identification de protéines ou domaines protéiques affectés dans une pathologie.

L'un des atouts de ces techniques est en effet d'identifier à l'intérieur d'un messager, et par conséquent de la protéine correspondante, les
15 domaines fonctionnels qui sont affectés dans une pathologie donnée. Cela permet d'assigner à un domaine donné une importance dans le développement ou le maintien d'un état pathologique. L'avantage immédiat de restreindre à un domaine précis d'une protéine l'impact d'une dérégulation pathologique est de proposer celui-ci comme une cible relevante pour un
20 criblage de petites molécules à visée thérapeutique. Ces informations constituent également des clefs qui permettent de concevoir des polypeptides à activité thérapeutique délivrables par thérapie génique; ces polypeptides peuvent notamment être des anticorps simple-chaînes dérivés d'anticorps neutralisants dirigés contre les domaines identifiés par les
25 techniques décrites ci-avant.

Plus spécifiquement, les méthodes selon l'invention permettent d'obtenir des molécules qui peuvent:

- être des séquences codantes qui dérivent d'exons alternatifs.
- correspondre à des séquences non codantes portées par des introns
- 30 épissés différemment d'un état physiopathologique à un autre.

De ces deux points, différents enseignements peuvent être tirés.

Les épissages alternatifs d'exons qui différencient deux états physiopathologiques traduisent un niveau de régulation de l'expression génétique qui permet de moduler (plus précisément d'abolir ou d'instaurer) une ou plusieurs fonctions d'une protéine donnée. Ainsi la plupart des

5 domaines structuraux et fonctionnels (SH2, SH3, PTB, PDZ, et les domaines catalytiques de différentes enzymes...) étant codés par plusieurs exons contigus, deux configurations peuvent se présenter :

i) Les domaines sont tronqués dans la situation pathologique (Zhu, Q. et al, 1994, J. Exp. Med., vol 180, n°2, pp461-470); cela indique que

10 les chemins de signalisation impliquant ces domaines doivent être restaurés dans un but thérapeutique.

ii) Les domaines sont maintenus au cours d'une pathologie alors qu'ils sont absents dans une situation saine; ces domaines peuvent être considérés comme des cibles de criblage de petites molécules

15 chimiques destinées à antagoniser les signaux transduits par l'intermédiaire de ces domaines.

Les séquences épissées différenciellement peuvent correspondre à des régions non-codantes situées en 5' ou en 3' de la séquence codante ou à des introns intervenant entre deux exons codants. Dans les régions non

20 codantes, ces épissages différentiels peuvent traduire une modification de la stabilité ou de la traductibilité du messager (Bloom, T. J., and Beavo, J. A., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol93, n° 24, pp 14188-14192; Ambartsumian, N. et al., 1995, Gene, vol 159, n° 1, pp 125-130). Ces phénomènes doivent alors être recherchés sur la base de ces informations et

25 peuvent mettre en évidence que l'accumulation ou la disparition de la protéine correspondante la désigne ainsi comme cible d'intérêt. Lorsque la rétention d'un intron se produit dans une séquence codante, il s'ensuit le plus souvent une troncature de la protéine naturelle par introduction de codon stop dans la phase de lecture (Varesco, L., et al, 1994, Hum. Genet., vol 93,

30 n°3, pp281-286; Canton, H., et al., 1996, Mol. Pharmacol., vol 50, n° 4, pp799-807, Ion, A., et al, 1996, Am. J. Hum. Genet., vol 58, n°6, pp1185-

1191). Avant de rencontrer ce codon stop, il se produit généralement une lecture de quelques codons supplémentaires, ce qui aboutit à adjoindre à la partie déjà traduite une séquence spécifique, témoin protéique de l'épissage alternatif. Ces acides aminés supplémentaires peuvent être utilisés pour
5 générer des anticorps spécifiques de la forme alternative caractéristique de la situation pathologique. Ces anticorps peuvent être ensuite utilisés comme outils de diagnostic. La protéine tronquée voit ses propriétés modifiées, voire altérées. Ainsi des enzymes peuvent être amputées de leur domaine catalytique ou de leur domaine régulateur, devenant inactives ou
10 constitutivement activées. Des adaptateurs peuvent perdre leur capacité à connecter différents partenaires d'une cascade de signalisation(Watanabe, K. et al, 1995, J. Biol. Chem., vol 270, n°23, pp13733-13739). Les produits d'épissage des récepteurs peuvent aboutir à des récepteurs qui ont perdu leur capacité à lier leur ligand (Nakajima, T. et al, 1996, Life Sci., vol58, n°9,
15 pp761-768) et peuvent également générer des formes de récepteurs solubles par relargage de leur domaine extracellulaire (Cheng J., 1994, Science, vol263, n° 5154, pp1759-1762). Dans ce cas, des tests diagnostiques peuvent être envisagés, basés sur la circulation dans les différents fluides physiologiques de forme soluble de récepteur à un ligand
20 donné.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation des méthodes, acides nucléiques ou banques décrits ci-dessus pour l'identification de domaines antigéniques spécifiques de protéines impliquées dans une pathologie. L'invention concerne également l'utilisation des acides
25 nucléiques, protéines ou peptides tels que décrits ci-avant pour le diagnostic de pathologies.

L'invention concerne également une méthode d'identification de protéines ou domaines protéiques impliqués dans une pathologie comprenant :

- 30 (a) l'hybridation des ARN messagers d'un échantillon pathologique avec les ADNc d'un échantillon sain,

(b) l'identification des épissages spécifiques de l'état pathologique par rapport à l'état sain,

(c) l'identification de la protéine ou domaine protéique correspondant à un ou plusieurs épissages identifiés en (b).

5 La ou les protéines ou domaines protéiques peuvent être isolés, séquencés, et utilisés dans des applications thérapeutiques ou diagnostiques, notamment pour la préparation d'anticorps.

A titre d'exemple plus spécifique, le criblage différentiel qualitatif de l'invention permet avantageusement de mettre en évidence des gènes
10 supprimeurs de tumeurs. En effet, de nombreux exemples indiquent que l'un des modes d'inactivation des gènes supprimeurs au cours de la progression tumorale est une inactivation par modulation de l'épissage de formes alternatives.

Ainsi, dans les carcinomes pulmonaires à petites cellules, le gène de
15 la protéine p130 qui appartient à la famille RB (protéine du rétinoblastôme) est muté à un site consensus d'épissage. La conséquence de cette mutation est l'élimination de l'exon 2 et une non synthèse de protéine due à la présence d'un codon stop précoce. Cette observation a été la première à souligner l'importance des membres de la famille RB dans la tumorigénèse.
20 De même, dans certains cancers du poumon non à petites cellules, le gène de la protéine p16INK4A, protéine qui est un inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes cdk4 et cdk6 est muté dans un site donneur d'épissage. Le résultat de cette mutation est la production d'une protéine tronquée à demi-vie courte ce qui a pour conséquence l'accumulation des formes
25 phosphorylées, inactives, de RB. Par ailleurs, WT1, le gène suppresseur de tumeur de Wilms, est transcrit en plusieurs ARN messagers générés par épissages alternatifs. Dans les cancers du sein, les proportions relatives des différents variants sont modifiées par rapport au tissu sain, fournissant des
30 outils diagnostics et des pistes pour comprendre l'importance des différents domaines fonctionnels de WT1 dans la progression tumorale. Ce même phénomène de modification des rapports entre différentes formes d'ARN

messagers et d'isoformes protéiques lors de la transformation cellulaire est retrouvé pour la neurofibrine NF1. En outre, cette notion de modulation des phénomènes d'épissage qui signe la progression tumorale est soutenue également par l'exemple de HDM2 dont 5 épissages alternatifs sont détectés
5 dans les carcinomes ovariens et pancréatiques et dont les expressions augmentent selon le stade d'avancement tumoral. D'autre part, dans les cancers de la tête et du cou, l'un des mécanismes d'inactivation de p53 implique une mutation dans un site consensus d'épissage.

Ces quelques exemples listés illustrent tout l'intérêt des techniques de
10 l'invention basées sur la recherche systématique des variations d'épissage qui distinguent une tumeur donnée du tissu sain voisin. Les résultats qui en découlent permettent en effet non seulement la caractérisation de gènes suppresseurs de tumeurs déjà connus mais également, compte tenu de l'aspect original et systématique des techniques de criblage différentiel
15 qualitatif, l'identification de nouvelles variations d'épissages spécifiques de tumeurs affectant vraisemblablement de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs.

L'invention a donc également pour objet un procédé d'identification de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'épissages au sein de gènes
20 suppresseurs de tumeurs, tel que défini ci-avant. Ce procédé peut avantageusement comprendre les étapes suivantes :

(a) l'hybridation des ARN messagers d'un échantillon de tumeur avec les ADNc d'un échantillon sain,

(b) l'identification des épissages spécifiques de l'échantillon tumoral
25 par rapport à l'état sain,

(c) l'identification de la protéine ou domaine protéique correspondant à un ou plusieurs épissages identifiés en (b).

Les propriétés suppresseur de tumeur des protéines ou domaines identifiés peuvent ensuite être testées dans différents modèles connus. Ces
30 protéines, ou leur forme native (possédant l'épissage observé dans le tissu sain), peuvent ensuite être utilisées dans des applications thérapeutiques ou

diagnostiques, notamment en thérapie génique antitumorale.

La présente demande a donc également pour objet non seulement les différents aspects de mise en oeuvre de la technologie mais aussi l'exploitation des informations qui en découlent à des fins de recherche, de développement de criblage de petites molécules chimiques, de développement d'outils de thérapie génique ou de diagnostic.

A ce titre, l'invention concerne également l'utilisation des méthodes, acides nucléiques ou banques décrits ci-dessus en génotoxicologie, c'est-à-dire pour anticiper (prédire) le potentiel toxique de composés tests.

Les programmes génétiques engagés lors du traitement de cellules ou de tissus par des agents toxiques sont en grande partie corrélés aux phénomènes d'apoptose ou mort cellulaire programmée. L'importance des phénomènes d'épissage alternatif dans la régulation de ces voies apoptotiques est bien illustrée par la littérature. Cependant, aucune technologie génomique décrite jusqu'à présent ne permettait de rechercher systématiquement et d'isoler de manière exhaustive les variations de séquences dues à des épissages alternatifs et distinguant deux situations physiopathologiques données. Les techniques de criblage différentiel qualitatif développées dans la présente invention permettent de regrouper l'ensemble des différences d'épissage qui existent entre deux situations dans des banques d'ADNc. La comparaison des séquences d'ARN (par exemple les ARN messagers) d'un tissu (ou d'une culture cellulaire) traité ou non avec un composé toxique de référence permet d'établir des banques d'ADNc qui regroupent les différences qualitatives de l'expression génique qui caractérisent l'action toxique étudiée. Ces banques d'ADNc peuvent ensuite être hybridées avec des sondes dérivées d'ARN extrait des mêmes tissus ou cellules traités avec un produit chimique dont on veut évaluer le potentiel toxique. La plus ou moins grande capacité de ces sondes à s'hybrider avec les informations génétiques spécifiques d'une situation toxique de référence permet de lui assigner un potentiel toxique.

L'évaluation du potentiel toxique peut s'effectuer plus particulièrement

selon deux approches :

Selon la première approche, le criblage différentiel qualitatif peut être réalisé entre un tissu ou une culture cellulaire de référence, d'une part non traité et d'autre part traité par le produit dont on veut évaluer la toxicité.

- 5 L'analyse des clones qui représentent les différences qualitatives spécifiquement induites par le produit permet ensuite éventuellement de détecter dans ces clones des événements caractéristiques d'ADNc impliqués dans les phénomènes liés à la toxicité comme l'apoptose.

- 10 L'apparition de ces marqueurs est suivie selon la dose et la durée du traitement par le produit et permet une approche de son profil toxicologique.

- La présente demande a donc également pour objet un procédé d'identification, par criblage différentiel qualitatif selon les techniques présentées ci-dessus, de marqueurs de toxicité induits dans un système biologique modèle par un composé chimique dont on veut tester le potentiel
15 toxique. A cet égard, l'invention concerne notamment un procédé de détermination ou d'évaluation de la toxicité d'un composé test sur un échantillon biologique donné comprenant la préparation d'une paire de banques de l'échantillon après ou sans traitement par le composé test, et la recherche de marqueurs de toxicité dans la banque spécifique des qualités
20 de l'échantillon après traitement.

- Selon la deuxième approche, des abaques pour différentes classes de produits toxiques rassemblent leur profil de toxicité selon les doses employées et selon les durées des traitements pour un tissu ou un modèle cellulaire de référence. A chaque point de ces abaques, des banques
25 d'ADNc qui rassemblent les différences d'épissages alternatifs peuvent être établies. Ces banques sont des banques différentielles: elles sont obtenues par soustraction des informations génétiques du point choisi dans les abaques et du point correspondant au modèle tissulaire ou cellulaire contrôle. Comme cela est illustré dans les exemples, le criblage différentiel
30 qualitatif repose sur l'hybridation d'ARNm extraits d'une situation avec les ADNc issues d'une autre. Comme indiqué plus haut, le criblage différentiel

qualitatif peut être également mené à partir d'ARN totaux ou d'ARN nucléaires contenant les pré-messagers.

A cet égard, l'invention concerne un procédé de détermination ou d'évaluation de la toxicité d'un composé test sur un échantillon biologique

5 donné comprenant l'hybridation :

- de banques de l'invention caractéristiques dudit échantillon biologique à l'état sain et à différents stades de toxicité résultant d'un traitement dudit échantillon avec un composé toxique de référence, avec,

- une préparation d'acides nucléiques de l'échantillon biologique traité

10 par ledit composé test, et

- l'évaluation du potentiel toxique du composé test par analyse du degré d'hybridation avec les différentes banques.

Selon ce procédé, pour chaque situation (doses de composé), deux hybridations réciproques sont avantageusement réalisées :

- 15
- ARN de la situation A et ADNc de la situation B (rA/cB)
 - ARN de la situation B et ADNc de la situation A (rB/cA).

A chaque situation toxique de référence, à chaque point des abaques, correspondent donc deux banques de criblage différentiel qualitatif. L'une de ces banques regroupe les variations qualitatives, c'est à dire les épissages

20 alternatifs, spécifiques de la situation normale de référence alors que l'autre banque rassemble les épissages spécifiques des événements toxiques. Ces banques sont répliquées sur des supports solides tels des filtres de nylon ou de nitrocellulose ou avantageusement sur des chips. Ces banques formées initialement par des fragments d'ADNc de longueur variable (selon les

25 événements d'épissages concernés) peuvent être optimisées par l'emploi d'oligonucléotides dérivés des séquences isolées initialement.

Lorsqu'un composé chimique est proposé pour un développement pharmaceutique, il peut être appliqué sur les mêmes modèles tissulaires ou cellulaires que ceux répertoriés dans les abaques de toxicité. Des sondes

30 moléculaires peuvent ensuite être réalisées à partir d'ARNm extraits des échantillons biologiques traités par le composé chimique d'intérêt. Ces

sondes sont ensuite hybridées à des filtres portant l'ADNc des banques rA/cB et rB/cA. Par exemple, la banque rA/cB peut contenir les séquences spécifiquement présentes dans la situation normale et la banque rB/cA les éléments d'épissage alternatifs spécifiques de la situation de toxicité.

5 L'innocuité ou la toxicité du composé chimique est alors aisément évaluée en fonction des profils d'hybridation d'une sonde dérivée d'ARNm extraits du modèle tissulaire ou cellulaire de référence traité par le composé testé:

- une hybridation efficace avec la banque rA/cB et aucun signal sur la banque rB/cA révèle une absence de toxicité du composé sur le
10 modèle étudié

- l'hybridation de la sonde avec des clones de la banque rB/cA indique une toxicité induite par le composé testé.

Des exemples d'application de constitutions de telles banques peuvent être fournis par des modèles de culture d'hépatocytes, telle la lignée
15 HepG2, traités par des agents toxiques tel l'éthanol.

Un exemple de choix peut également être fourni par l'utilisation en cosmétologie de modèles de culture de peau traités ou non par des agents toxiques ou irritants.

La présente demande a donc également pour objet des banques de
20 criblage différentiel à partir d'organes, de tissus ou de cultures cellulaires de référence traités avec des composés chimiques représentatifs de grandes classes d'agents toxiques selon les abaques décrites dans la littérature. L'invention concerne aussi l'étalement de ces banques sur des filtres ou sur des supports connus de l'homme de l'art (nitrocellulose, nylon...).

25 Avantageusement ces supports peuvent être des chips ou puces qui définissent ainsi des puces de génotoxicité. L'invention concerne en outre l'exploitation qui peut être faite du séquençage des différents clones qui constituent ces banques dans le but d'élucider les mécanismes mis en jeu par l'action des différents toxiques, ainsi que l'utilisation de ces banques pour

30 les hybrider avec des sondes provenant de cellules ou de tissus traités par un composé chimique ou un produit pharmaceutique dont on veut évaluer la

toxicité. Avantageusement, l'invention concerne des banques d'acides nucléiques telles que définies ci-avant, préparées à partir de cellules de la peau traitées en différentes conditions toxiques. L'invention concerne en outre un kit comprenant ces différentes banques différentielles de la peau.

5 L'invention concerne également l'utilisation des méthodes, acides nucléiques ou banques décrits ci-dessus pour évaluer (prédire) ou améliorer le potentiel thérapeutique de composés tests (génopharmacologie).

Dans cette utilisation, le principe mis en application est très proche de celui décrit précédemment. Les deux banques de référence sont établies à
10 partir d'une culture cellulaire ou d'un organe contrôle et de leur équivalent mimant un modèle de pathologie. L'efficacité thérapeutique d'un produit peut alors être évaluée en suivant sa capacité à antagoniser les variations qualitatives de l'expression génique qui sont spécifiques du modèle pathologique. Cela est mis en évidence par la modification du profil
15 d'hybridation d'une sonde issue du modèle pathologique sur les banques de références: sans traitement, la sonde n'hybride qu'avec la banque qui contient les signatures d'épissage spécifiques de la maladie. Après traitement avec un produit efficace, la sonde bien que provenant du modèle pathologique hybride préférentiellement avec l'autre banque, qui porte les
20 signatures du modèle équivalent sain.

A cet égard, l'invention concerne également un procédé de détermination ou d'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'un composé test sur un échantillon biologique donné comprenant l'hybridation :

- de banques de l'invention caractéristiques dudit échantillon
25 biologique à l'état sain et à (différents stades de développement de) l'état pathologique avec,
- une préparation d'acides nucléiques de l'échantillon biologique traité par ledit composé test, et
- l'évaluation du potentiel thérapeutique du composé test par analyse
30 du degré d'hybridation avec les différentes banques.

Un exemple d'une telle application peut être fourni par un modèle

d'apoptose mimant certains aspects de la neurodégénérescence qui sont antagonisés par des facteurs trophiques de référence. Ainsi les cellules dérivées de phéochromocytômes PC12 différenciées en corps neuronaux en présence de NGF entrent en apoptose par retrait de ce facteur de croissance. Cette apoptose est accompagnée par expression de nombreux
5 marqueurs de mort cellulaire programmée dont plusieurs sont régulés par épissage alternatif et dont l'apparition est inhibée par action d'IGF1. Deux banques issues de criblage différentiel qualitatif sont établies à partir d'ARNm extraits de cellules PC12 différenciées entrées en apoptose par
10 retrait de NGF d'une part et à partir de PC12 différenciées sauvegardées de l'apoptose par ajout d'IGF1 d'autre part. Sur ces banques peuvent être hybridées des sondes réalisées à partir d'ARNm extraits de PC12 différenciées entrées en apoptose et dont la survie est améliorée par traitement avec un produit neuroprotecteur à tester. L'efficacité de l'inversion
15 des caractéristiques qualitatives induites par le composé test peut donc être appréciée par la capacité de la sonde à hybrider spécifiquement les clones spécifiques de la banque représentative des cellules dont la survie est améliorée. Ce test peut par la suite être utilisé pour tester l'efficacité de dérivés du composé ou de tout autre nouvelle famille de composés
20 neuroprotecteurs et en améliorer le profil pharmacologique.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé de l'invention permet d'évaluer l'efficacité d'une composé test neuroprotecteur par hybridation avec une banque différentielle selon l'invention entre une cellule nerveuse saine et cette cellule présentant un modèle de
25 neurodégénérescence.

Dans un autre mode, il s'agit de tester un composé anti-tumoral sur des banques différentielles établies à partir d'un échantillon de cellules tumorales et un échantillon sain.

Comme indiqué ci-avant, le procédé de l'invention peut en outre être
30 utilisé pour améliorer les propriétés d'un composé, en testant différents dérivés pour leur capacité à induire un profil d'hybridation proche de la

banque représentative de l'échantillon sain.

L'invention concerne également l'utilisation des méthodes, acides nucléiques ou banques décrits ci-dessus en pharmacogénomique, i.e., pour évaluer (prédire) la réponse d'un patient à un composé ou traitement test.

5 La pharmacogénomique a pour ambition d'établir des profils génétiques de patients afin de déterminer quel traitement est susceptible d'être couronné de succès pour une pathologie donnée. Les techniques décrites dans la présente invention permettent à cet égard d'établir des banques d'ADNc représentatives des différences qualitatives qui existent
10 entre une situation pathologique qui répond à un traitement donné et une autre qui répond peu ou mal, susceptible d'être l'objet d'une autre stratégie thérapeutique. Ces banques de références établies, elles peuvent être hybridées avec des sondes réalisées à partir d'ARN messagers de patients. Les résultats d'hybridation permettent de savoir quel patient a un profil
15 d'hybridation correspondant à la situation de répondeur ou de non répondeur et ainsi d'affiner le choix de traitement.

Dans cette application, le but est d'une part de proposer en fonction du patient le traitement le plus approprié, le plus susceptible d'être couronné de succès et d'autre part d'enrôler dans un traitement les patients les plus
20 susceptibles d'y répondre avec succès. Comme dans les autres applications, deux banques de criblage différentiel qualitatif sont réalisées: l'une à partir d'un modèle ou d'un échantillon pathologique connu pour répondre à un traitement, l'autre à partir d'un autre modèle ou échantillon pathologique qui répond peu ou mal à l'action thérapeutique. Ces deux banques sont ensuite
25 hybridées avec des sondes provenant d'ARNm extraits de biopsies de différents patients. Selon que ces sondes hybrident préférentiellement avec les épissages alternatifs spécifiques de l'une ou l'autre situation, les patients peuvent être répartis en répondeurs et en non répondeurs au traitement de référence qui a défini les modèles de départ.

30 A cet égard, l'invention concerne également un procédé de détermination ou d'évaluation de la réponse d'un patient à un composé ou

traitement test comprenant l'hybridation :

- d'une banque caractéristique d'un échantillon biologique répondeur audit composé/traitement et d'une banque caractéristique d'un échantillon biologique non-répondeur ou mal-répondeur audit composé/traitement, avec,
- 5 - une préparation d'acides nucléiques d'un échantillon biologique pathologique du patient, et
- l'évaluation du potentiel répondeur du patient par analyse du degré d'hybridation avec les différentes banques.

Un exemple de choix de l'apport du criblage différentiel qualitatif à la
10 pharmacogénomique est constitué par un criblage différentiel qualitatif entre deux tumeurs de même origine histologique, l'une régressant lors du traitement par un composé antitumoral (par exemple un transfert d'un ADNc codant pour la protéine p53 sauvage par thérapie génique), l'autre se montrant réfractaire à ce traitement. La première retombée de la constitution
15 de banques de différences qualitatives entre ces deux situations est de déterminer, par analyse des clones qui constituent ces banques, quels mécanismes moléculaires sont mobilisés lors de la régression du premier modèle et ne sont pas présents dans le deuxième.

Ensuite, l'utilisation de filtres ou tout autre support présentant les ADNc de
20 ces banques permet de réaliser des hybridations avec des sondes dérivées d'ARNm de biopsies de tumeurs dont on veut anticiper la réponse audit traitement. Ces résultats permettent ainsi de proposer un enrôlement optimisé des patients dans un protocole clinique.

Un exemple particulier de ce procédé consiste à déterminer la
25 réponse de tumeurs à un traitement par le gène suppresseur de tumeur p53. Il a en effet été décrit que certains patients et certaines tumeurs répondent plus ou moins bien à ce type de traitement (Roth et al., Nature Medicine, 2 (1995) 958). Il est donc important de pouvoir déterminer quels types de tumeurs et/ou quels patients sont sensibles à un traitement par thérapie
30 génique par p53 sauvage, afin d'optimiser le traitement et de favoriser l'enrôlement des patients dans les essais cliniques en cours. Le procédé de

l'invention permet avantageusement de faciliter ces étapes en proposant des banques spécifiques des qualités de cellules répondeuses et de cellules non répondeuses à p53. Des exemples de modèles cellulaires p53-sensibles ou résistants sont décrits par exemple par Sabbatini et al. (Genes Dev. 9 (1995) 2184) ou par Roemer et al. (Oncogene 12 (1996) 2069). L'hybridation de ces banques avec des sondes dérivées de biopsies de patients permet aisément d'évaluer leur potentiel répondeur. En outre les banques spécifiques permettent également d'identifier des acides nucléiques impliqués dans la réponse à p53.

La présente demande concerne donc également l'établissement de banques de criblage différentiel à partir d'échantillons pathologiques, ou de modèles de pathologie, qui répondent différemment à au moins un agent pharmacologique. Ces banques peuvent être des banques restreintes, complexes ou autologues comme définies ci-dessus. Elle concerne aussi l'étalement de ces banques sur des filtres ou sur des supports connus de l'homme de l'art (nitrocellulose, nylon...). Avantageusement ces supports peuvent être des chips ou puces qui définissent ainsi des puces de pharmacogénomique. L'invention porte encore sur l'exploitation qui peut être faite du séquençage des différents clones qui constituent ces banques dans le but d'élucider les mécanismes qui président aux différences de réponses d'échantillons pathologiques à différents traitement, ainsi que l'utilisation de ces banques pour les hybrider avec des sondes provenant de biopsies provenant de situations pathologiques dont on veut anticiper la réponse au traitement de référence qui définit les banques.

D'autres avantages et applications de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

30

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique des criblages différentiels selon l'invention utilisant une (figure 1A) ou deux (figure 1B) hybridations, et utilisation des acides nucléiques (figure 1C).

5

Figure 2. Représentation schématique décrivant l'obtention d'hybrides ARN/ADN permettant de caractériser les séquences ARN simple brin, signatures spécifiques de l'état pathologique ou de l'état sain.

10 Figure 3. Représentation schématique décrivant un moyen permettant d'isoler et de caractériser par séquençage les séquences d'ARN simple brin spécifiques d'une situation pathologique ou d'une situation saine.

Figure 4. Représentation schématique décrivant un autre moyen permettant
15 de caractériser par séquençage tout ou une partie des ARNs simple brin spécifiques d'une situation pathologique ou d'une situation saine.

Figure 5. Représentation schématique permettant d'isoler les produits d'épissages alternatifs grâce à des structures R-loop

20

Figure 6. Apports du criblage différentiel qualitatif aux différentes étapes de la recherche et du développement pharmaceutique.

Figure 7. Mode opératoire pour évaluer le potentiel toxique d'un produit.

25

Figure 8. Mode opératoire pour suivre l'efficacité d'un produit.

Figure 9. Mode opératoire pour étudier la susceptibilité d'une situation pathologique à un traitement.

30

EXEMPLES

1. CLONAGE DIFFÉRENTIEL DES EPISSAGES ALTERNATIFS EN UTILISANT DES ADNc SIMPLE-BRINS

5 Les ARN messagers correspondant à deux situations, l'une normale (mN) et l'autre pathologique (mP), sont isolés à partir de biopsies ou de cellules en culture. Ces ARN messagers sont convertis en ADN complémentaires (cN) et (cP) à l'aide de reverse transcriptase (RT). Des hybrides mN/cP et cN/mP sont ensuite réalisés en phase liquide (se reporter au schéma de la figure 2
10 illustrant un des deux cas aboutissant à la formation de cN/mP). Ces hybrides sont avantageusement réalisés en émulsion phénolique (technique PERT ou Phenol Emulsion DNA Reassociation Technique) maintenue par thermocycles (Miller, R.,D. and Riblet, R., 1995, Nucleic Acids Research, vol 23, n°12, pp 2339-2340). Typiquement, cette étape d'hybridation est réalisée
15 entre 0,1 à 1 µg d'ARN polyA+ et 0,1 à 2µg d'ADN complémentaire dans une émulsion formée d'une phase aqueuse (tampon phosphate de sodium 120mM, NaCl 2,5M, EDTA 10mM) et d'une phase organique représentant 8% de la phase aqueuse et constituée de phénol bidistillé. Nous disposons alors d'hétéroduplex ARN/ADN dont la perfection d'appariement dépend de
20 l'efficacité de la RT à synthétiser la longueur totale des ADNc. Demeurent également sous forme de simples brins les régions d'ARN (et d'ADN) qui correspondent aux épissages alternatifs qui différencient les deux états physiopathologiques étudiés. Le but de la méthode est de caractériser l'information génétique portée par ces boucles d'épissage. Pour cela
25 plusieurs variantes expérimentales sont envisageables:

A. Une première approche consiste à isoler ces boucles et à les cloner (Figure 3).

Les hétéroduplex ARN/ADN sont soumis à l'action de la RNase H qui va
30 dégrader les ARN hybridés à l'ADN selon les protocoles connus de l'homme de l'art. Les produits de cette hydrolyse sont d'une part l'ADN et d'autre part

les fragments d'ARN qui correspondent aux boucles d'épissage ou aux régions non hybridées du fait du rendement partiel de la RT. Ces fragments sont séparés de l'ADN par des techniques classiques, les amorces de RT pouvant par exemple être biotinylées. Il est ensuite procédé à une ligation
5 d'oligonucléotides à chacune des extrémités par action de la RNA ligase selon les conditions connues de l'homme de l'art. Ces oligonucléotides sont ensuite utilisés comme amorces pour effectuer une RT PCR. Les produits de PCR sont clonés et criblés avec des sondes d'ADN complémentaires totales correspondant aux deux situations physiopathologiques d'intérêt. Seuls les
10 clones hybridant préférentiellement avec une seule des deux sondes contiennent les boucles d'épissage qui sont ensuite séquencées.

B. La seconde approche (Figure 4) consiste à faire agir la RT sur les hétéroduplex purifiés au préalable grâce à la biotinylation des amorces de
15 l'ADN ou sur l'ARN simple brin libéré après action de la RNaseH, comme décrit ci-dessus. Cette RT est initiée à l'aide d'amorces formées d'hexanucléotides aléatoires en 3' et d'une séquence déterminée en 5'. Les amorces sont donc susceptibles de s'hybrider n'importe où sur l'ARN simple brin. Un deuxième brin est ensuite synthétisé également de façon aléatoire.
20 Une PCR avec des amorces correspondant aux séquences spécifiques des extrémités 5' et 3' permet ensuite d'obtenir des séquences dérivées des boucles d'épissage.

Ces deux exemples permettent la production de compositions d'acides
25 nucléiques représentatifs des épissages différentiels dans les deux situations testées.

2. CLONAGE DIFFÉRENTIEL DES EPISSAGES ALTERNATIFS EN UTILISANT DES ADNc DOUBLE-BRINS (FIGURE 5).

30

Les ARNs messagers correspondants aux situations normales (mN) et

pathologiques (mP) sont produits, ainsi que les ADNs complémentaires double brin correspondants (dsN et dsP) par des protocoles classiques de biologie moléculaire. Des structures de type "R-loop" sont alors obtenues en hybridant mN avec dsP et mP avec dsN dans une solution contenant 70% de formamide. Les domaines nucléiques différenciellement épissés entre la situation N et P resteront sous forme d'ADN double brin. Les simples brins d'ADN déplacés sont alors traités au glyoxal afin d'éviter le redéplacement du brin d'ARN lors du retrait de la formamide. Après retrait de la formamide et du glyoxal puis traitement à la RNaseH, nous nous retrouvons avec des structures de type abeille, les ADNs simples brin non appariés représentant les ailes de l'abeille et le domaine double brin apparié d'intérêt représentant le corps de l'abeille. L'utilisation d'un mutant de nucléase micrococcalle spécifique des ADNs simples brins permet l'isolation de l'ADN resté sous forme double brin qui est ensuite cloné puis séquencé. Cette deuxième technique permet l'obtention directe d'une empreinte ADN double brin du domaine d'intérêt comparativement au premier protocole qui produit une empreinte ARN.

3. CONSTRUCTION DE BANQUES ISSUES DE CRIBLAGES DIFFÉRENTIELS QUALITATIFS.

Les deux exemples décrits ci-dessus aboutissent aux clonages d'ADNc représentatifs de toute ou partie des séquences épissées différenciellement entre deux situations physiopathologiques données. Ces ADNc permettent la constitution de banques par insertion de ces ADNc dans des vecteurs plasmidiques ou phagiques. Ces banques peuvent être présentées sur des filtres de nitrocellulose ou tout autre support connu de l'homme de l'art, tels des chips ou biopuces ou membranes. Ces banques peuvent être conservées au froid, à l'abri de la lumière. Ces banques, une fois déposées et fixées sur support par les techniques classiques, peuvent être traitées par des composés pour éliminer les cellules.

L'une des caractéristiques et en même temps l'une des originalités du criblage différentiel qualitatif est que cette technique aboutit avantageusement non pas à une mais à deux banques différentielles ("paire de banque") qui représentent l'ensemble des différences qualitatives qui existent entre deux situations données. En particulier, l'une des banques d'épissage différentiel de l'invention représente la signature des qualités de la situation physiologique test par rapport à la situation physiologique de référence, et l'autre banque représente la signature des qualités de la situation physiologique de référence par rapport à la situation physiologique test. Ce couple de banques est également désigné paire de banques ou "banque différentielle d'épissage".

4. UTILISATIONS ET APPORTS DES BANQUES DIFFÉRENTIELLES QUALITATIVES.

15

Les possibilités d'utilisation des banques différentielles d'épissage de l'invention sont illustrées notamment sur les Figures 6 à 9. Ainsi, ces banques sont utilisables pour :

4.1. L'évaluation du potentiel toxique d'un composé (figure 7) :

Dans cet exemple, la situation de référence est désignée A et la situation toxique est désignée B. Des abaques de toxicité sont obtenues par traitement de la situation A en présence de différentes concentrations d'un composé toxique de référence, pendant des périodes variables. A différents points les abaques de toxicité, des banques différentielles qualitatives sont construites (paires de banque), dans cet exemple, des banques restreintes rA/cB et rB/cA . Les paires de banque sont avantageusement déposées sur un support. Le support est ensuite hybridé avec des sondes issues de l'échantillon biologique initial traité par différentes doses de composés test : Produits X, Y et Z. L'hybridation est révélée et fait apparaître le potentiel toxique des produits test : dans cet exemple, le produit Z présente une forte

toxicité et le produit Y offre un profil intermédiaire.

4.2. L'évaluation de l'efficacité d'une composition pharmaceutique (figure 8) :

5 Dans cet exemple, une paire de banques restreintes selon l'invention est réalisée à partir d'un modèle pathologique B et d'un modèle sain A (ou du modèle pathologique traité avec un produit actif de référence). Les banques différentielles rA/cB et rB/cA sont, le cas échéant, déposées sur un support. Cette paire de banque regroupe les différences d'épissage entre les deux
10 situations. Cette paire de banque permet d'évaluer l'efficacité d'un composé test, c'est-à-dire de déterminer sa capacité à générer un profil de type "sain" (rA/cB) à partir du profil de type pathologique (rB/cA). Dans cet exemple, la paire de banque est hybridée avec des sondes préparées à partir des situations A et B avec ou sans traitement par le composé test. Le profil
15 d'hybridation est présenté sur la figure 8.

4.3. L'anticipation de la réponse d'un échantillon pathologique à un traitement (figure 9) :

Dans cet exemple, une paire de banque restreinte selon l'invention est
20 réalisée à partir de deux modèles pathologique, dont l'un répond à un traitement par un produit donné (le gène p53 sauvage) : situation A ; et l'autre y est réfractaire : situation B. Cette paire de banque (rA/cB ; rB/cA) est déposée sur un support.

Cette paire de banque est ensuite utilisée pour déterminer la
25 sensibilité d'un échantillon pathologique test à ce même produit. Pour cela, cette paire de banque est hybridée avec des sondes provenant de biopsies de patients dont on souhaite anticiper la réponse au traitement de référence. Le profil d'hybridation d'une biopsie de répondeur et d'une biopsie de non-répondeur est présenté sur la figure 9.

30 Comme il ressort de la description ci-avant, l'invention concerne également :

- toute sonde nucléique, tout oligonucléotide, tout anticorps dirigé contre une séquence identifiée par la technique décrite dans la présente demande et caractérisés en ce qu'ils permettent de caractériser une situation pathologique,
- 5 - l'utilisation des informations issues de l'utilisation des techniques décrites pour la recherche de molécules organiques à visée thérapeutique par la mise en place de criblages caractérisés en ce qu'ils ciblent des domaines splicés différenciellement entre une situation saine et une situation pathologique ou bien caractérisés en ce qu'ils sont basés sur l'inhibition des
- 10 gains de fonctions acquis par la protéine résultant d'un épissage différentiel,
 - l'utilisation des informations issues des techniques décrites dans la présente demande pour des applications de thérapie génique,
 - l'utilisation d'ADNc transférés par thérapie génique caractérisés en ce qu'ils ont des propriétés antagonistes ou agonistes sur des voies de
 - 15 signalisation cellulaires définies,
 - toute constitution et toute utilisation de banques moléculaires d'exons ou d'introns alternatifs à des fins:
 - . de diagnostic ou de réactifs commerciaux pour la recherche
 - . de créer ou de rechercher des molécules, polypeptides, acides
 - 20 nucléiques pour application thérapeutique.
 - toute constitution et toute utilisation de banques virtuelles informatiques regroupant des exons ou introns alternatifs caractérisés en ce que ces banques permettent de concevoir des sondes nucléiques ou des amorces oligonucléotidiques dans le but de caractériser les épissages
 - 25 alternatifs qui différencient deux états physiopathologiques distincts.
 - toute composition pharmaceutique ou diagnostique comprenant des polypeptides, acides nucléiques sens ou anti-sens, ou des molécules chimiques capables d'interférer avec les produits d'épissage alternatifs mis en évidence et clonés par les techniques de l'invention,
 - 30 - toute composition pharmaceutique ou diagnostique comprenant des polypeptides, acides nucléiques sens ou anti-sens, ou des molécules

chimiques capables de restaurer un épissage représentatifs d'une situation normale par opposition à l'événement alternatif caractéristique d'une situation pathologique.

- l'utilisation d'un acide nucléique ou composé identifié par le procédé
- 5 de l'invention, pour la détection d'anomalies génétiques dans un échantillon.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'identification et/ou de clonage de régions d'acides nucléiques épissées différemment entre deux situations physiologiques, comprenant
5 l'hybridation d'ARN provenant de la situation test avec les ADNc provenant de la situation de référence et l'identification et/ou le clonage d'acides nucléiques correspondant à des épissages différentiels.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend :
10 (a) l'hybridation d'ARN provenant de la situation test avec les ADNc provenant de la situation de référence;
 (b) l'hybridation d'ARN provenant de la situation de référence avec les ADNc provenant de la situation test; et
 (c) l'identification et/ou le clonage d'acides nucléiques correspondant à
15 des épissages différentiels.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que les ADNc sont des ADNc simple-brins et l'étape (c) comprend l'identification et/ou le clonage de régions d'ARN non appariées.
20
4. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que les ADNc sont des ADNc double-brins et l'étape (c) comprend l'identification et/ou le clonage de régions d'ADN appariées.
- 25 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que l'échantillon biologique est composé de cellules, d'un tissu, d'un organe ou d'une biopsie.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 pour l'identification et/ou le
30 clonage d'épissages alternatifs différentiels entre des cellules tumorales et des cellules non-tumorales.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 pour l'identification et/ou le clonage d'épissages alternatifs différentiels entre des cellules traitées par un composé test et des cellules non-traitées.

5

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 pour l'identification et/ou le clonage d'épissages alternatifs différentiels entre des cellules en apoptose et des cellules non-apoptotiques.

10 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'hybridation est réalisée en phase liquide.

10. Procédé d'identification et/ou de clonage de régions d'acides nucléiques épissées différentiellement entre deux situations physiologiques A et B,
15 comprenant :

(a) la formation d'hétéroduplex en phase liquide entre les ARN messagers provenant de la situation A et les ADNc provenant de la situation B d'une part;

(b) la formation d'hétéroduplex en phase liquide entre les ARN
20 messagers provenant de la situation B et les ADNc provenant de la situation A d'autre part; et

(c) l'identification et/ou le clonage des régions d'ARN non appariées dans les hétéroduplex obtenus en (a) et en (b).

25 11. Procédé d'identification et/ou de clonage de régions d'acides nucléiques épissées différentiellement entre deux situations physiologiques A et B, comprenant :

(a) la formation d'hétéroduplex entre les ARN messagers provenant de la situation A et les ADNc provenant de la situation B d'une part, les ARN ou
30 les ADNc étant immobilisés sur un support ;

(b) la formation d'hétéroduplex entre les ARN messagers provenant de

la situation B et les ADNc provenant de la situation A d'autre part, les ARN ou les ADNc étant immobilisés sur un support ; et

(c) l'identification et/ou le clonage des régions d'ARN non appariées dans les hétéroduplex obtenus en (a) et en (b).

5

12. Composition comprenant les acides nucléiques identifiés et/ou clonés selon les procédés des revendications 1 à 11.

13. Composition d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'elle comprend
10 essentiellement les acides nucléiques correspondant aux épissages alternatifs distinguant deux situations physiologiques d'une cellule ou d'un tissu.

14. Composition selon les revendications 12 ou 13 caractérisée en ce que
15 les acides nucléiques sont clonés dans des vecteurs.

15. Banque d'acides nucléiques comprenant des acides nucléiques spécifiques d'épissages alternatifs distinguant deux situations physiologiques d'une cellule ou d'un tissu.

20

16. Banque selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une banque restreinte aux épissages alternatifs qui caractérisent les ARN matures.

25 17. Banque selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une banque complexe des épissages alternatifs qui caractérisent les transcrits.

18. Banque selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une banque autologue caractéristique des épissages alternatifs entre les ARN
30 matures et pré-messagers d'une situation physiologique.

19. Banque d'acides nucléiques comprenant des oligonucléotides spécifiques d'épissages alternatifs distinguant deux situations physiologiques.
- 5 20. Banque de microorganismes comprenant des microorganismes transformés par des acides nucléiques spécifiques d'épissages alternatifs distinguant deux situations physiologiques d'une cellule ou d'un tissu.
21. Banque selon les revendications 15 à 20 caractérisée en ce qu'elle est
10 déposée sur un support.
22. Kit comprenant un support sur lequel est déposé une banque selon l'une des revendications 15 à 20.
- 15 23. Kit selon la revendication 22 caractérisé en ce qu'il comprend deux banques selon l'une des revendications 15 à 20, déposée sur un même support ou sur deux supports distincts.
24. Kit selon les revendications 22 ou 23 caractérisé en ce que le support est
20 composé d'un filtre, membrane ou d'une puce.
25. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 12 à 14 ou d'une banque selon les revendications 15 à 20 pour l'identification de molécules actives.
- 25 26. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 12 à 14 ou d'une banque selon les revendications 15 à 20 pour l'identification de protéines ou domaines protéiques affectés dans une pathologie.
- 30 27. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 12 à 14 ou d'une banque selon les revendications 15 à 20 pour l'identification de

domaines antigéniques spécifiques de protéines impliquées dans une pathologie.

28. Méthode d'identification de protéines ou domaines protéiques impliqués
5 dans une pathologie comprenant :

(a) l'hybridation des ARN messagers d'un échantillon pathologique avec les ADNc d'un échantillon sain,

(b) l'identification des épissages spécifiques de l'état pathologique par rapport à l'état sain,

10 (c) l'identification de la protéine ou domaine protéique correspondant à un épissage identifié en (b).

29. Procédé d'identification de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'épissages au sein de gènes suppresseurs de tumeurs, comprenant :

15 (a) l'hybridation des ARN messagers d'un échantillon de tumeur avec les ADNc d'un échantillon sain,

(b) l'identification des épissages spécifiques de l'échantillon tumoral par rapport à l'état sain,

20 (c) l'identification de la protéine ou domaine protéique correspondant à un ou épissage identifié en (b).

30. Composition comprenant un composé capable d'interférer avec les produits d'épissages alternatifs identifiés selon le procédé des revendications 1 à 11.

25

31. Protéine susceptible d'être identifiée par le procédé de la revendication 28.

32. Utilisation d'une banque selon les revendications 15 à 20 ou d'un kit
30 selon les revendications 22 à 24 pour évaluer la toxicité d'un composé.

33. Procédé de détermination ou d'évaluation de la toxicité d'un composé test sur un échantillon biologique donné comprenant la préparation de banques d'épissages différentiels de l'échantillon après ou sans traitement par le composé test, et la recherche de marqueurs de toxicité dans la
5 banque spécifique des qualités de l'échantillon après traitement.

34. Procédé de détermination ou d'évaluation de la toxicité d'un composé test sur un échantillon biologique donné comprenant l'hybridation :

- de banques d'épissage différentiel caractéristiques dudit échantillon
10 biologique à l'état sain et à différents stades de toxicité résultant d'un traitement dudit échantillon avec un composé toxique de référence, avec,
- une préparation d'acides nucléiques de l'échantillon biologique traité par ledit composé test, et
- l'évaluation du potentiel toxique du composé test par analyse du
15 degré d'hybridation avec les différentes banques.

35. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que l'échantillon biologique est une culture d'hépatocytes, traitée ou non par un agent toxique, de préférence l'éthanol.
20

36. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que l'échantillon biologique est une culture de peau traitée ou non par des agents toxiques ou irritants.

25 37. Utilisation d'une banque selon les revendications 15 à 20 ou d'un kit selon les revendications 22 à 24 pour évaluer l'efficacité d'un composé.

38. Procédé de détermination ou d'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'un composé test sur un échantillon biologique donné comprenant
30 l'hybridation :

- de banques d'épissages différentiels caractéristiques dudit

échantillon biologique à l'état sain et à l'état pathologique avec,

- une préparation d'acides nucléiques de l'échantillon biologique traité par ledit composé test, et

- l'évaluation du potentiel thérapeutique du composé test par analyse
5 du degré d'hybridation avec les différentes banques.

39. Utilisation d'une banque selon les revendications 15 à 20 ou d'un kit selon les revendications 22 à 24 pour évaluer la réponse d'un échantillon pathologique à un composé.

10

40. Procédé de détermination ou d'évaluation de la réponse d'un patient à un composé ou traitement test comprenant l'hybridation :

- d'une banque d'épissage différentiel caractéristique d'un échantillon biologique répondeur audit composé/traitement et d'une banque
15 caractéristique d'un échantillon biologique non-répondeur ou mal-répondeur audit composé/traitement, avec,

- une préparation d'acides nucléiques d'un échantillon biologique pathologique du patient, et

- l'évaluation du potentiel répondeur du patient par analyse du degré
20 d'hybridation avec les différentes banques.

41. Procédé selon la revendication 40 pour la détermination ou l'évaluation de la réponse d'un patient à un composé ou traitement antitumoral.

25 42. Procédé selon la revendication 41 pour la détermination ou l'évaluation de la réponse d'un patient à un traitement antitumoral par transfert du gène p53 sauvage.

43. Acide nucléique susceptible d'être identifié par le procédé selon les
30 revendications 1 à 11.

44. Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 43 pour la détection d'anomalies génétiques dans un échantillon.

45. Utilisation d'un composé selon la revendication 27 pour la détection d'une
5 anomalie génétique dans un échantillon.

46. Anticorps dirigé contre une protéine ou un domaine protéique tel que défini dans la revendication 26 ou 27.

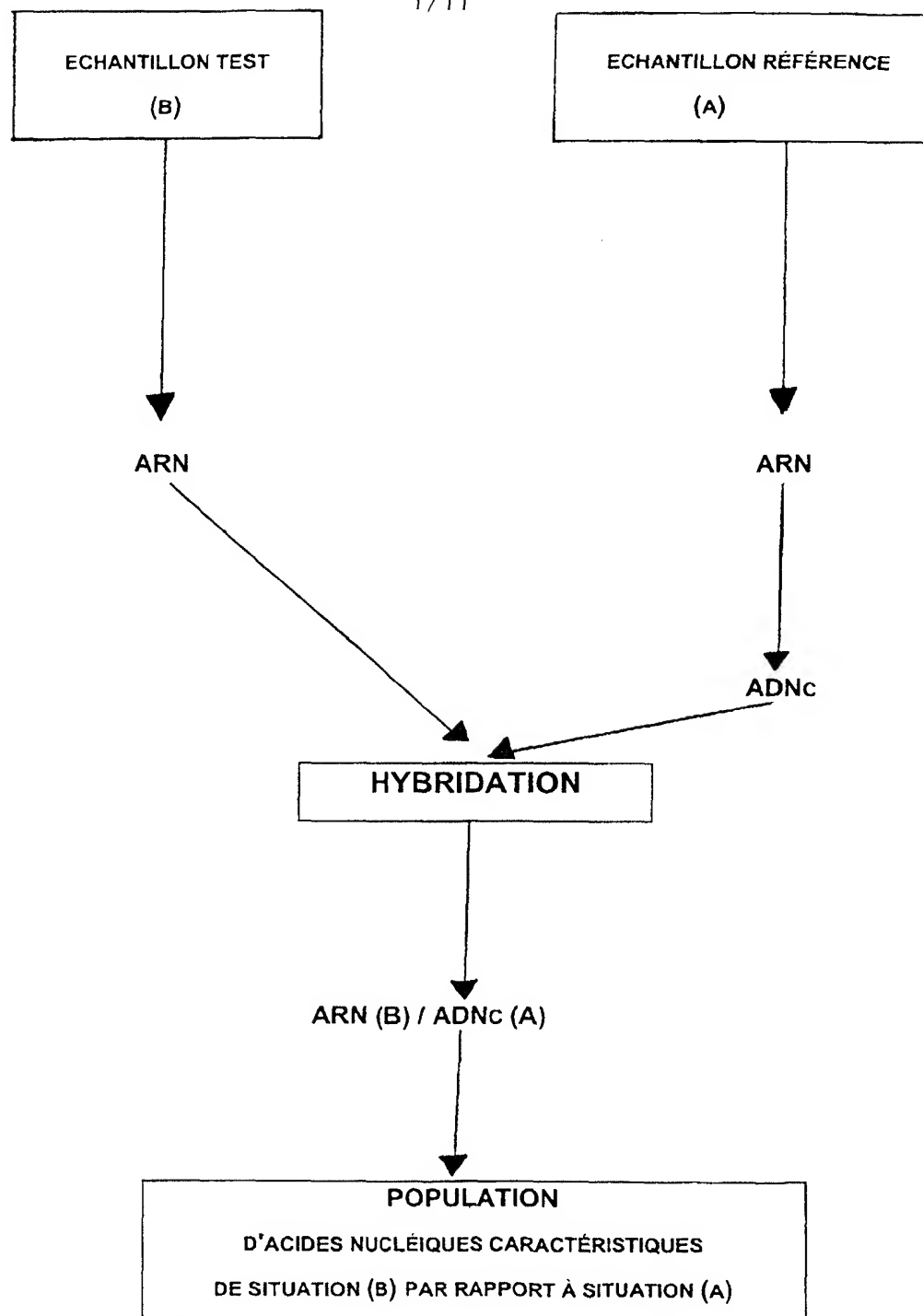


FIGURE 1A

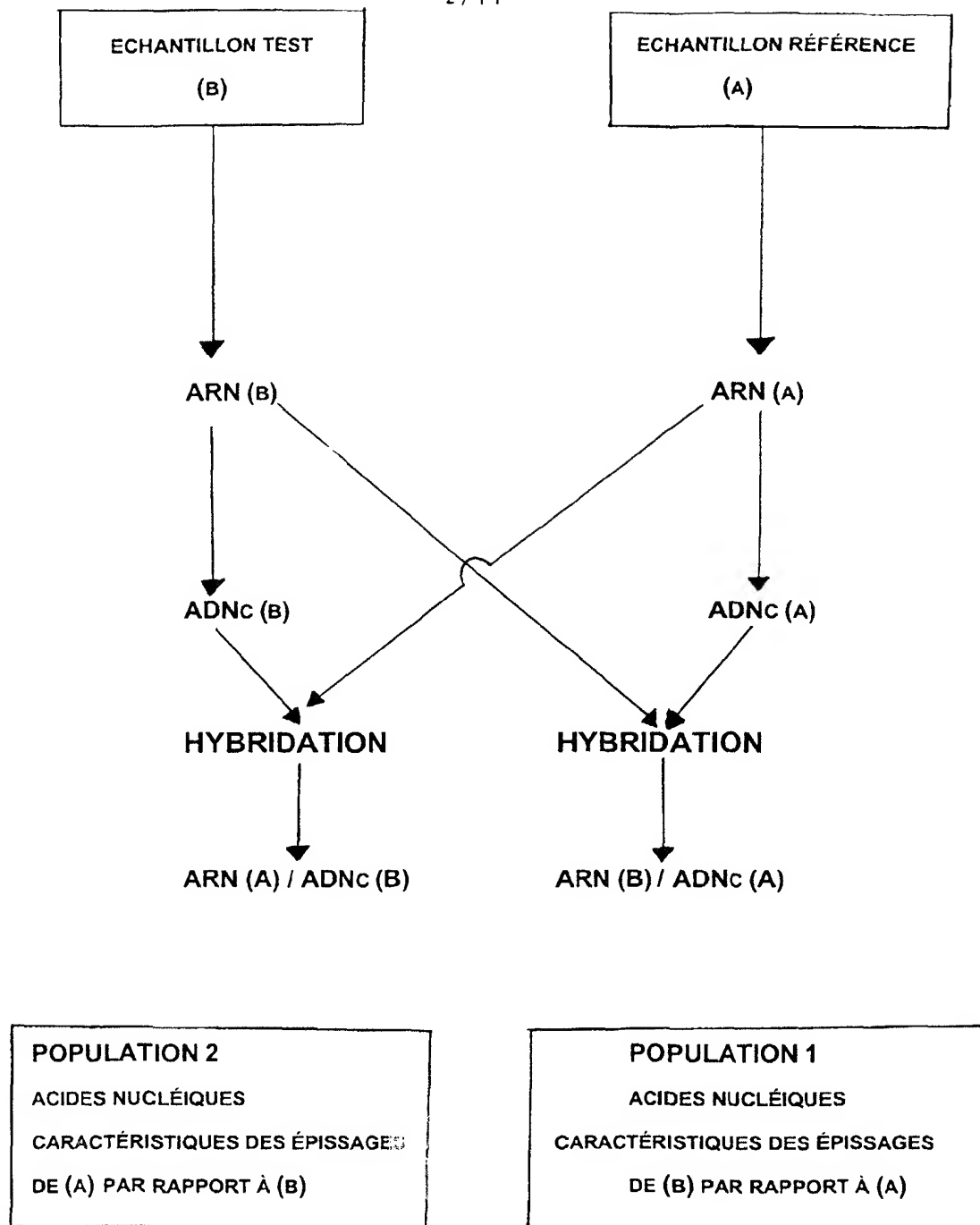


FIGURE 1B

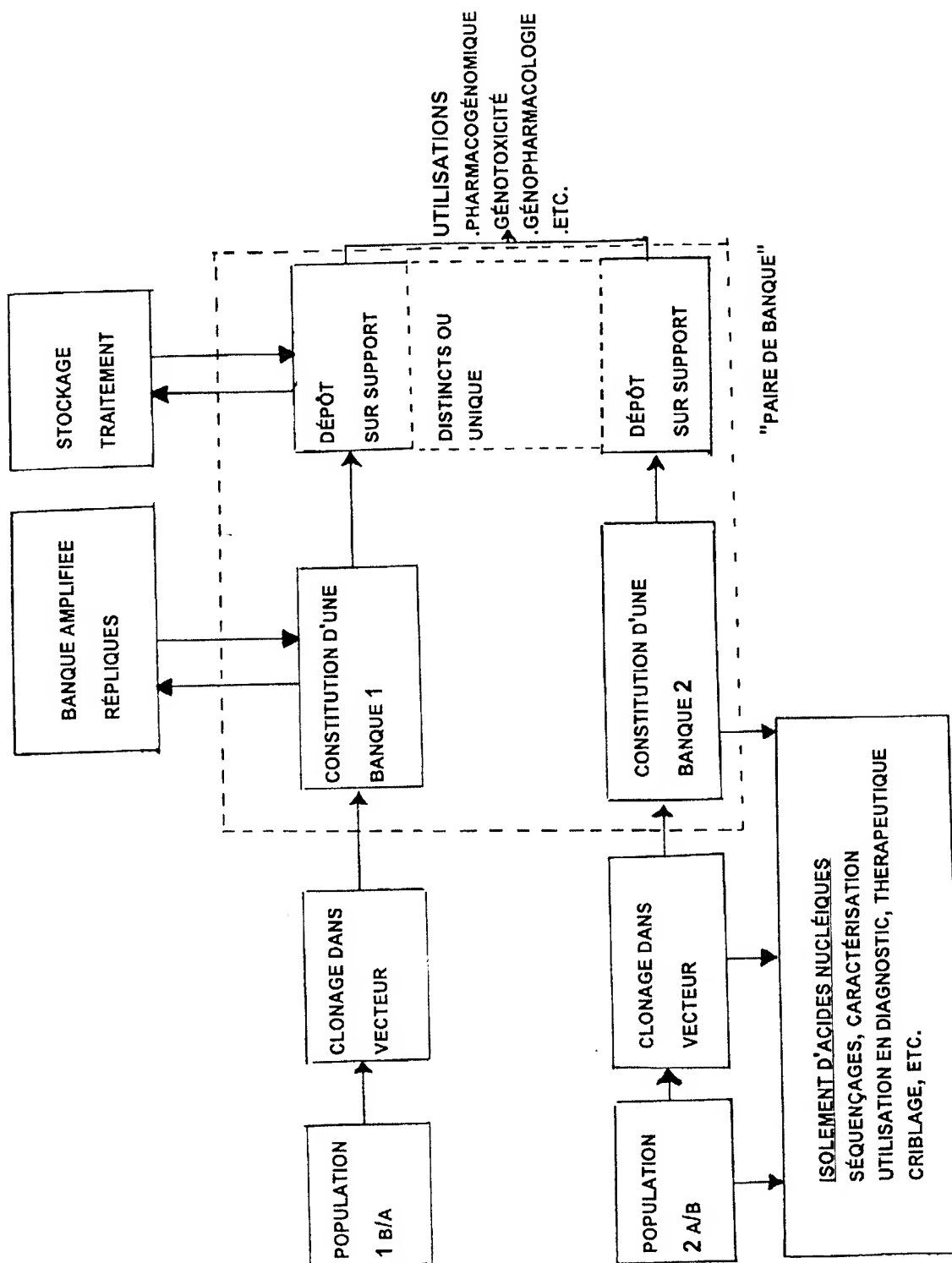


FIGURE 1C

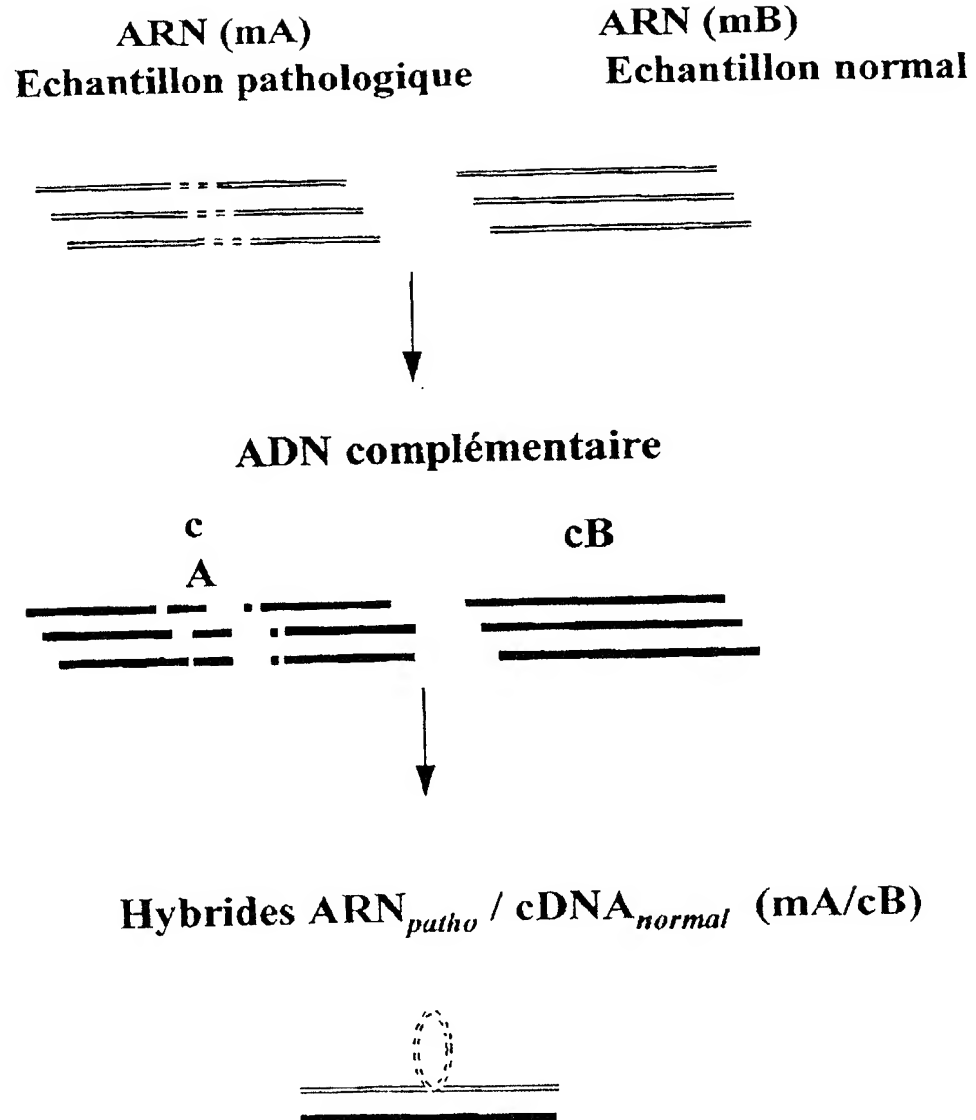
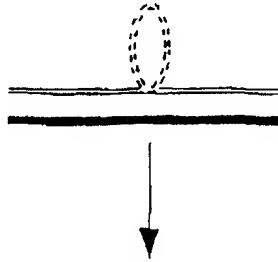


FIGURE 2

Hybrides ARN_{patho} / $cDNA_{normal}$ **Séquence non épissée après digestion à la RNaseH**

=====

**Séquence recherchée marquée en 5' et 3'
à l'aide de deux oligonucléotides****|||||=====|||****Fragment amplifié par PCR****|||||———|||****Clonage et séquençage****FIGURE 3**

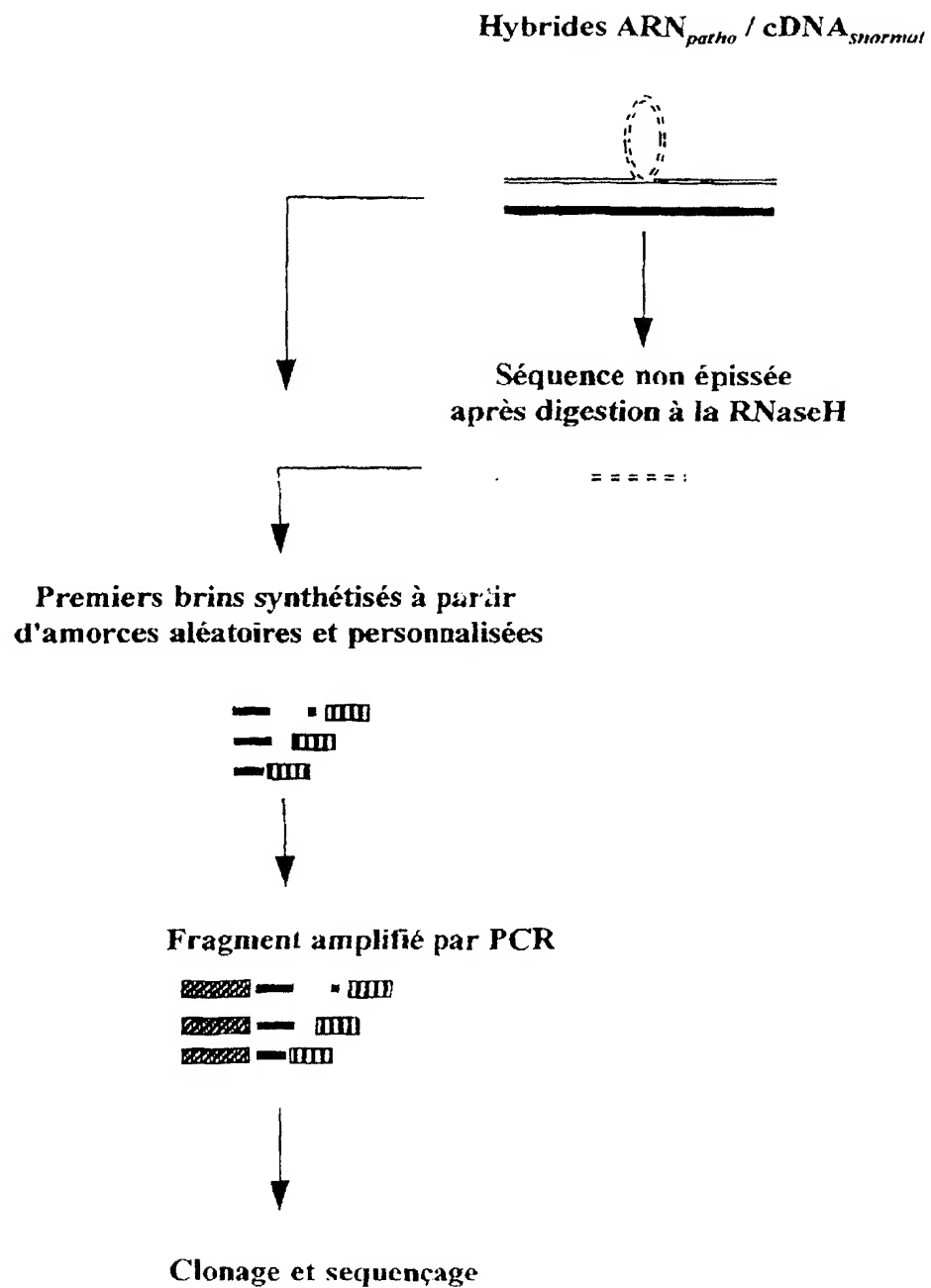


FIGURE 4

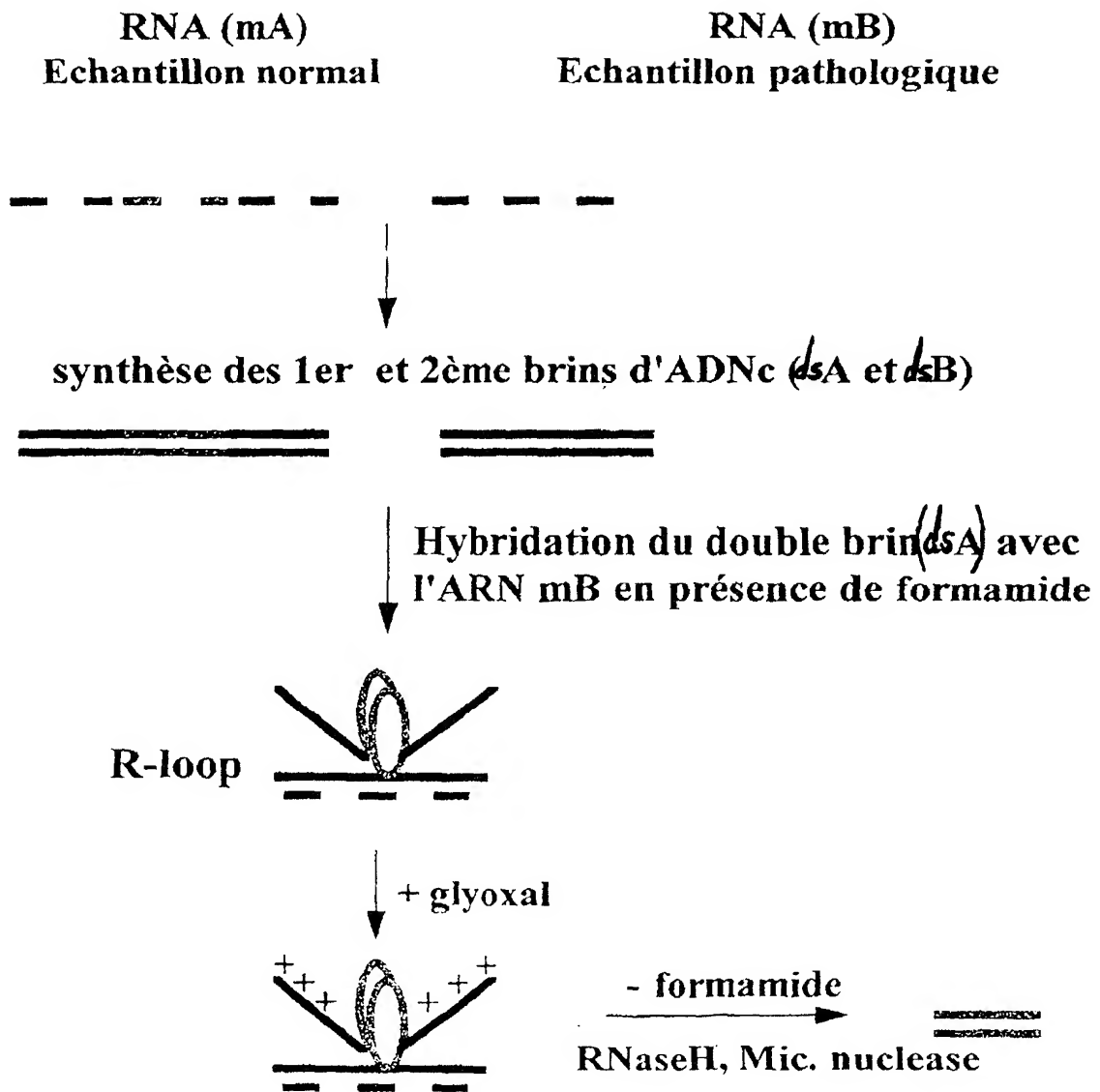


FIGURE 5

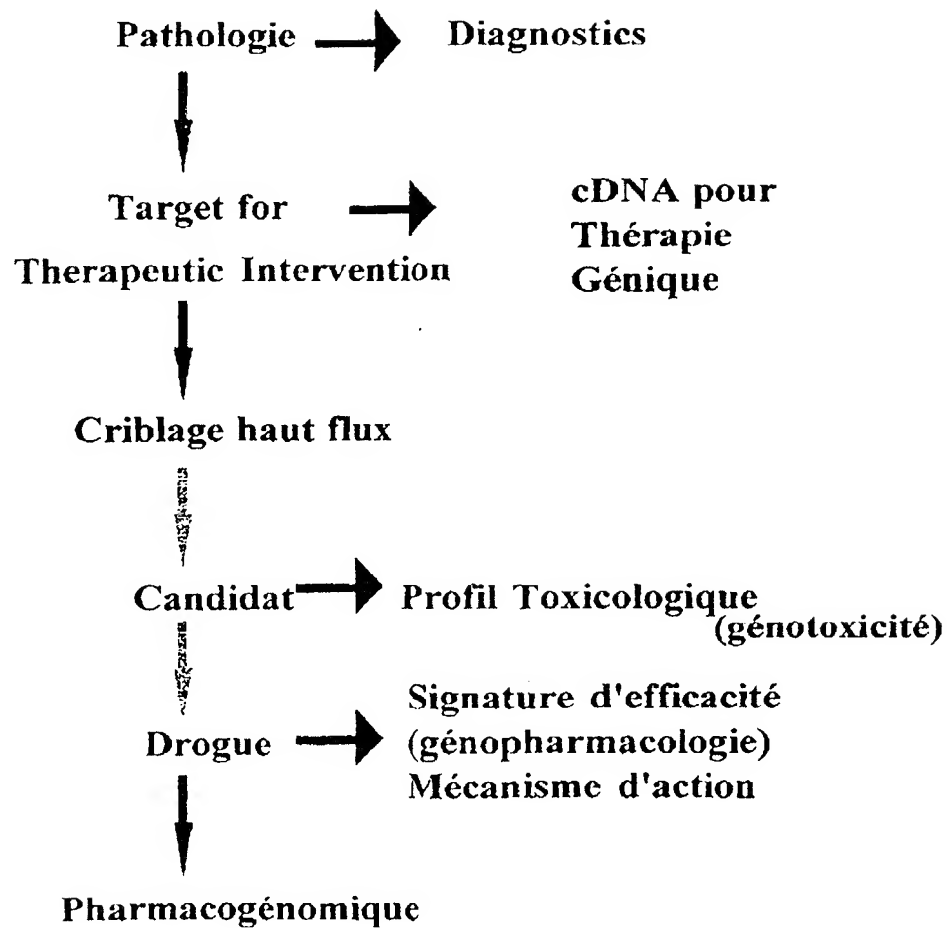


FIGURE 6

9/11

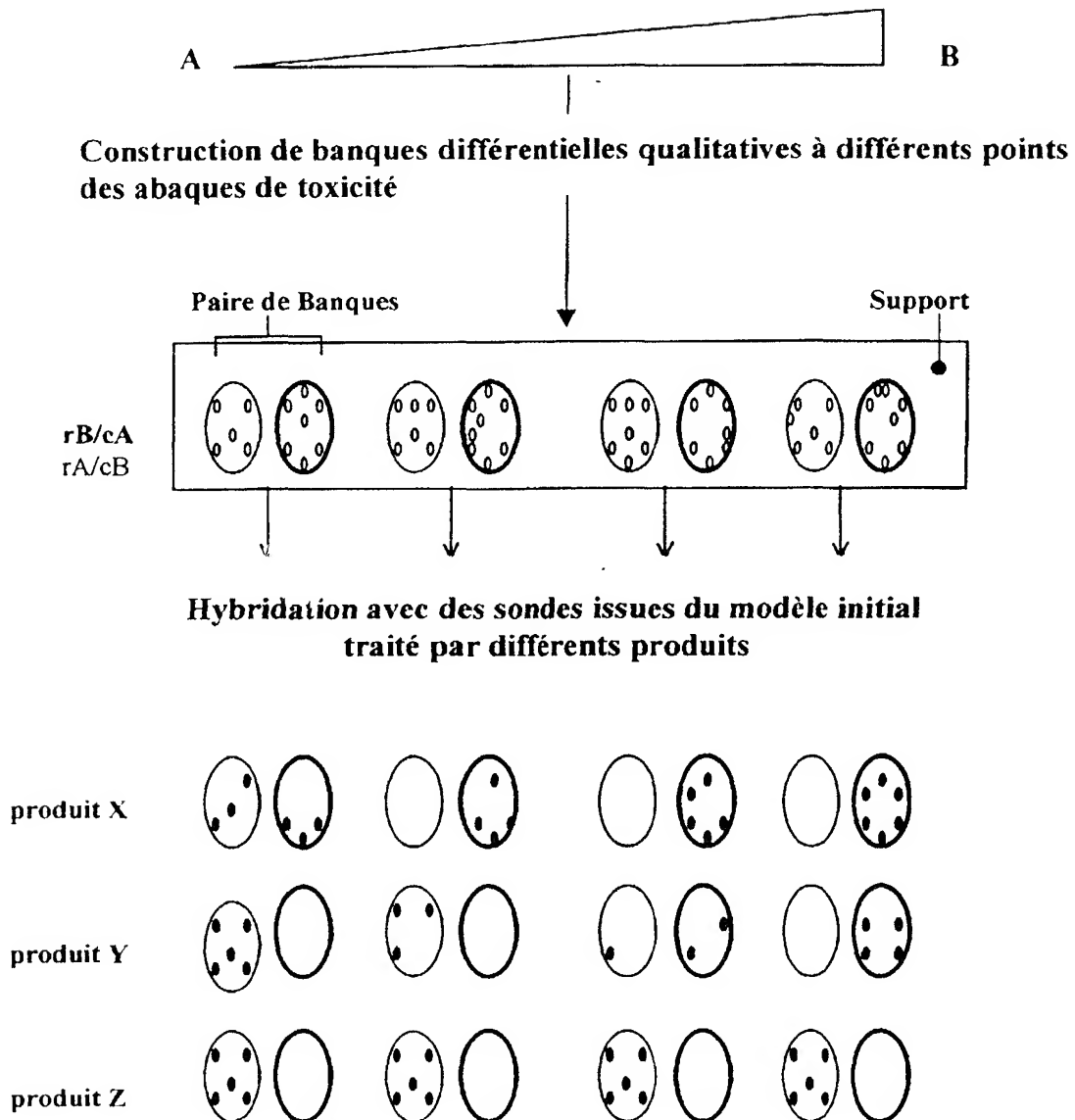


FIGURE 7

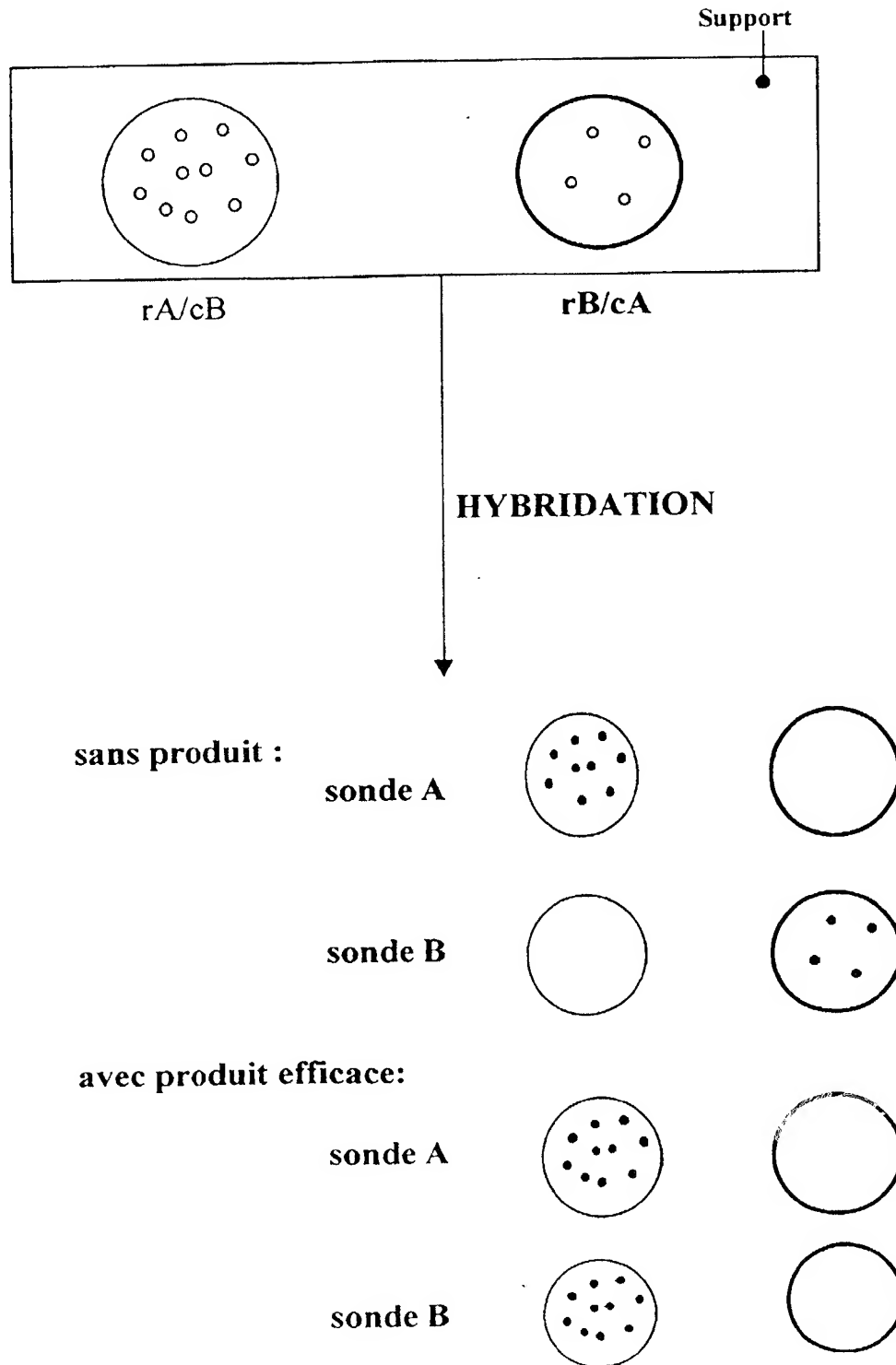
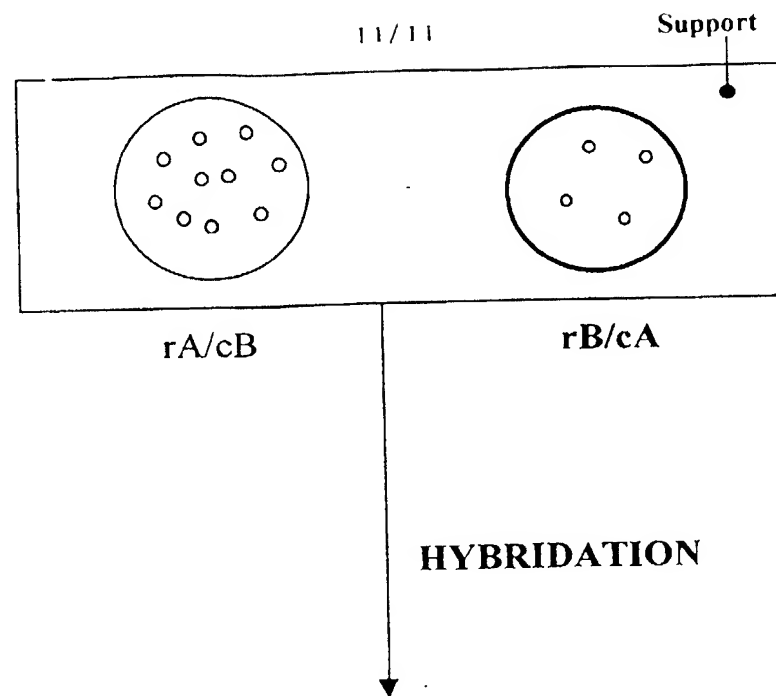


FIGURE 8



biopsie de répondeurs:



biopsies de non répondeurs:



FIGURE 9

2775984

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 557521
FR 9802997

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	COOPER D L ET AL: "GENE THERAPY ADVANCES: UTILIZATION OF ALTERNATIVE SPLICING AS A CONTROL ELEMENT IN THE CHIMERIC ENZYME/PRODRUG THERAPY (CEPT) APPROACH TO PRIMARY AND METASTATIC TUMORS" JOURNAL OF CLINICAL LIGAND ASSAY, vol. 19, no. 1, 1996, pages 80-84, XP002038774 * le document en entier *	1,5-7, 12,13, 25-27, 30,31, 37-41, 43-46
X	WO 95 27052 A (UNIV MARYLAND) 12 octobre 1995	13,14, 25,26
Y	* abrégé; revendications 1-16 *	37,38,40
X	WO 96 26272 A (HESTON WARREN D W ;SLOAN KETTERING INST CANCER (US); ISRAELI RON S) 29 août 1996	1,5,6,9, 12-14, 25-27, 43-45
Y	* abrégé; revendications 1-20; exemple 6 *	10,11,38
X	WO 98 02576 A (UNIV MASSACHUSETTS) 22 janvier 1998	1,5,6,9, 12-14, 25-27,43
Y	* abrégé; revendications 1,4,7,10,11,14 *	2-4,10, 11, 15-21, 44,45
X	FR 2 664 287 A (INST NAT SANTE RECH MED) 10 janvier 1992	1,5,9, 12-14, 43,46
Y	* abrégé; revendications 1-15 *	2-4,7
	-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
8 décembre 1998		Knehr, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03 82 (P04C13)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2775984

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

etabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 557521
FR 9802997

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	ALPHEY L: "PCR-based method isolation of full-length clones and splice variants from cDNA libraries" BIOTECHNIQUES, vol. 22, 1997, pages 481-486, XP002087172 * le document en entier *	15-27, 32-34, 37-42
Y	ARDLEY H C ET AL.: "Rapid isolation of genomic clones for individual members of human multigene families: Identification and localisation of UBE2L4, a novel member of a ubiquitin conjugating enzyme dispersed gene family" CYTOGENETICS AND CELL GENETICS, vol. 79, 1997, pages 188-192, XP002087173 * abrégé * * page 188, colonne 1, alinéa 1 - page 190, colonne 1, alinéa 1; figure 1 *	15-27, 32-34, 37-42
Y	BONASS W A ET AL.: "The rat amelogenin gene - some aspects of evolution and expression" ADVANCES IN DENTAL RESEARCH, vol. 10, no. 2, 1996, pages 182-186, XP002087174 * le document en entier *	15-27, 32-34, 37-42
Y	WO 94 12631 A (ISIS INNOVATION ; TARIN DAVID (GB); MATSUMURA YASUHIRO (GB)) 9 juin 1994 * le document en entier *	1,5-7, 12-14, 25-27, 43-46
Y	WO 97 46679 A (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL) 11 décembre 1997 * abrégé; revendications 1-32 *	1,5-7, 9-14, 25-31, 38,43,46
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
8 décembre 1998		Knehr, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 1503 01 92 (P04C13)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

etabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2775984

N° d'enregistrement
national

FA 557521
FR 9802997

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	EP 0 806 478 A (HEALTH RESEARCH INC) 12 novembre 1997 * le document en entier *	6,29,41, 42,44,45
Y	WO 96 30512 A (RHONE POULENC RORER SA ;BRACCO LAURENT (FR); SCHWEIGHOFFER FABIEN) 3 octobre 1996 * le document en entier *	1,10-15, 19,22, 25-31, 37-40,43
Y	US 5 679 541 A (LEISERSON WILLIAM M ET AL) 21 octobre 1997 * abrégé * * colonne 21, ligne 9 - ligne 36 *	1,5,8, 15, 19-21,30
Y	WO 97 04092 A (RHONE POULENC RORER SA ;CONSEILLER EMMANUEL (FR); BRACCO LAURENT () 6 février 1997 * abrégé; revendications 1-53 *	1,5-9, 29,41, 42,44,45
D,Y	MILLER R D AND RIBLET R: "Improved phenol emulsion DNA reassociation technique (PERT) using thermal cycling" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 12, 1995, pages 2339-2340, XP002087175 * le document en entier *	1,9
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
8 décembre 1998		Knehr, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03 82 (P04C13)

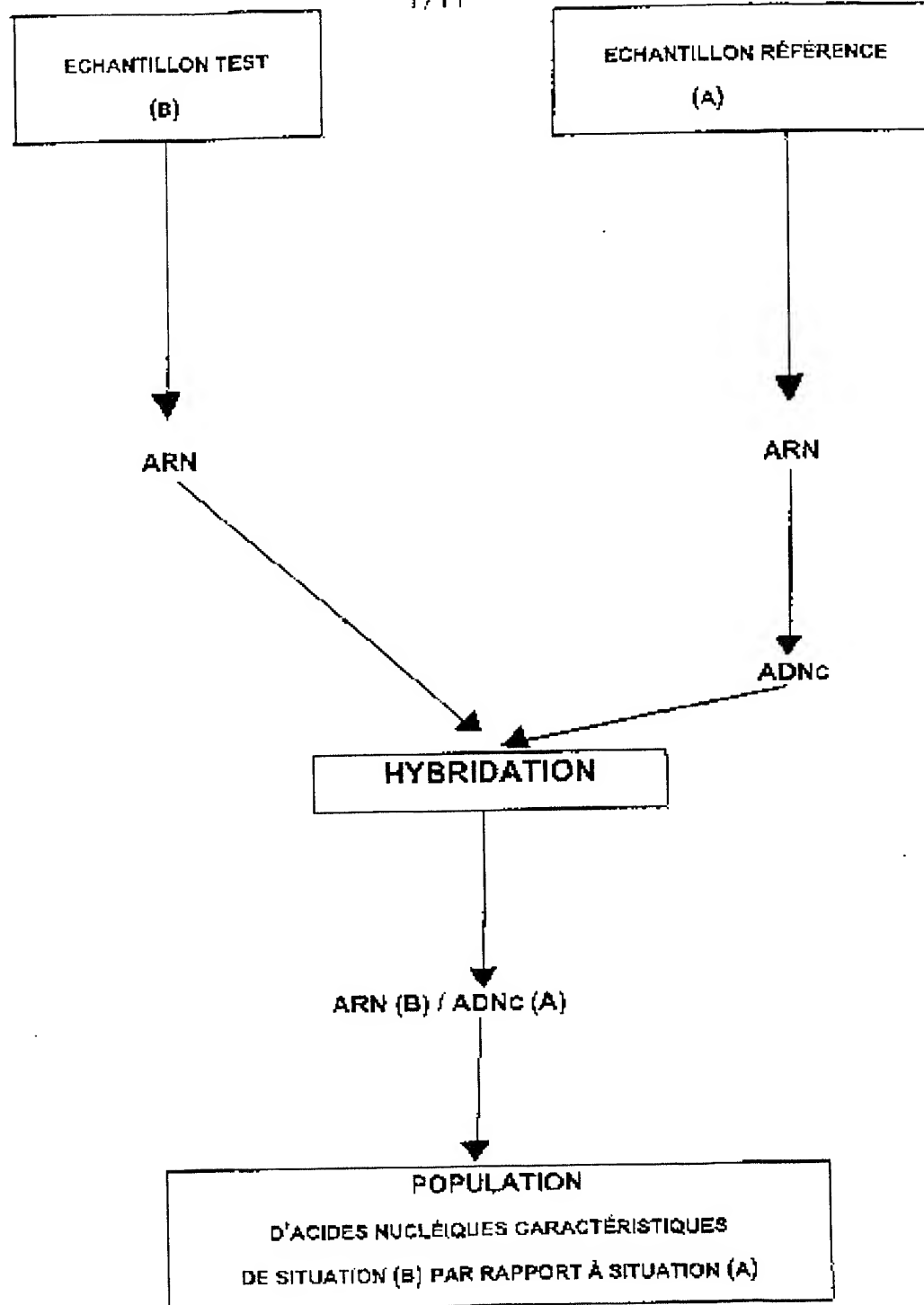


FIGURE 1A

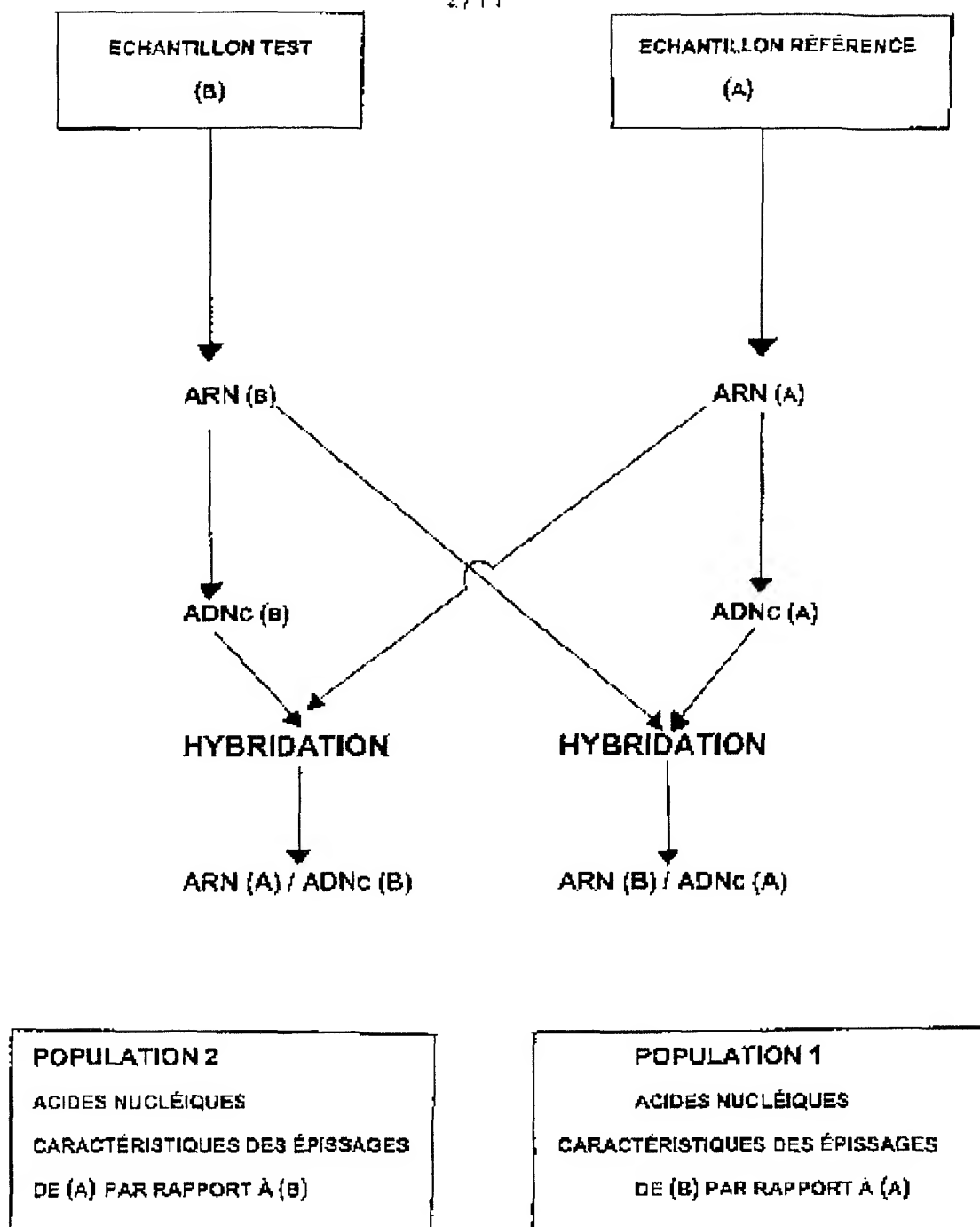


FIGURE 1B

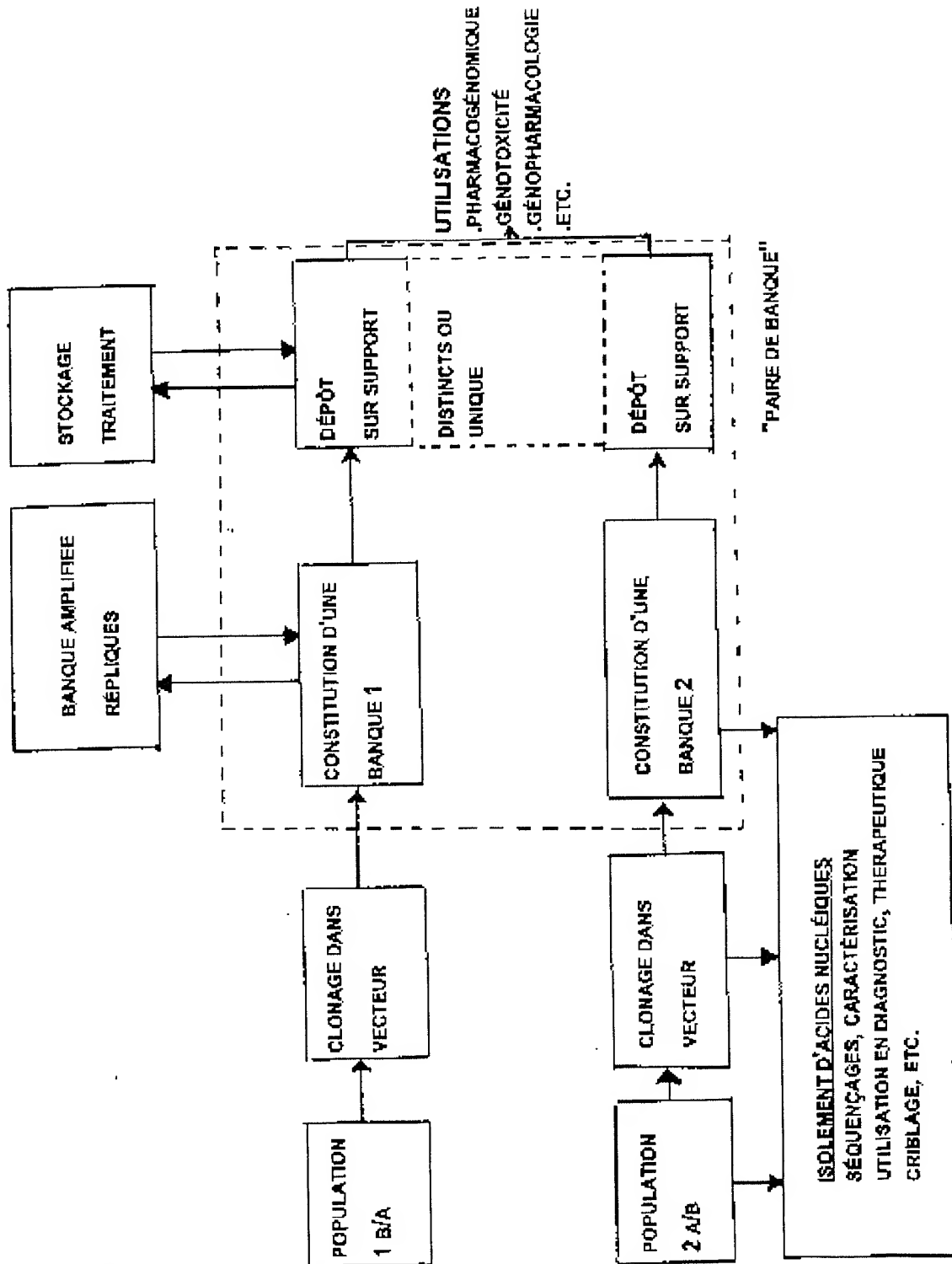


FIGURE 1C

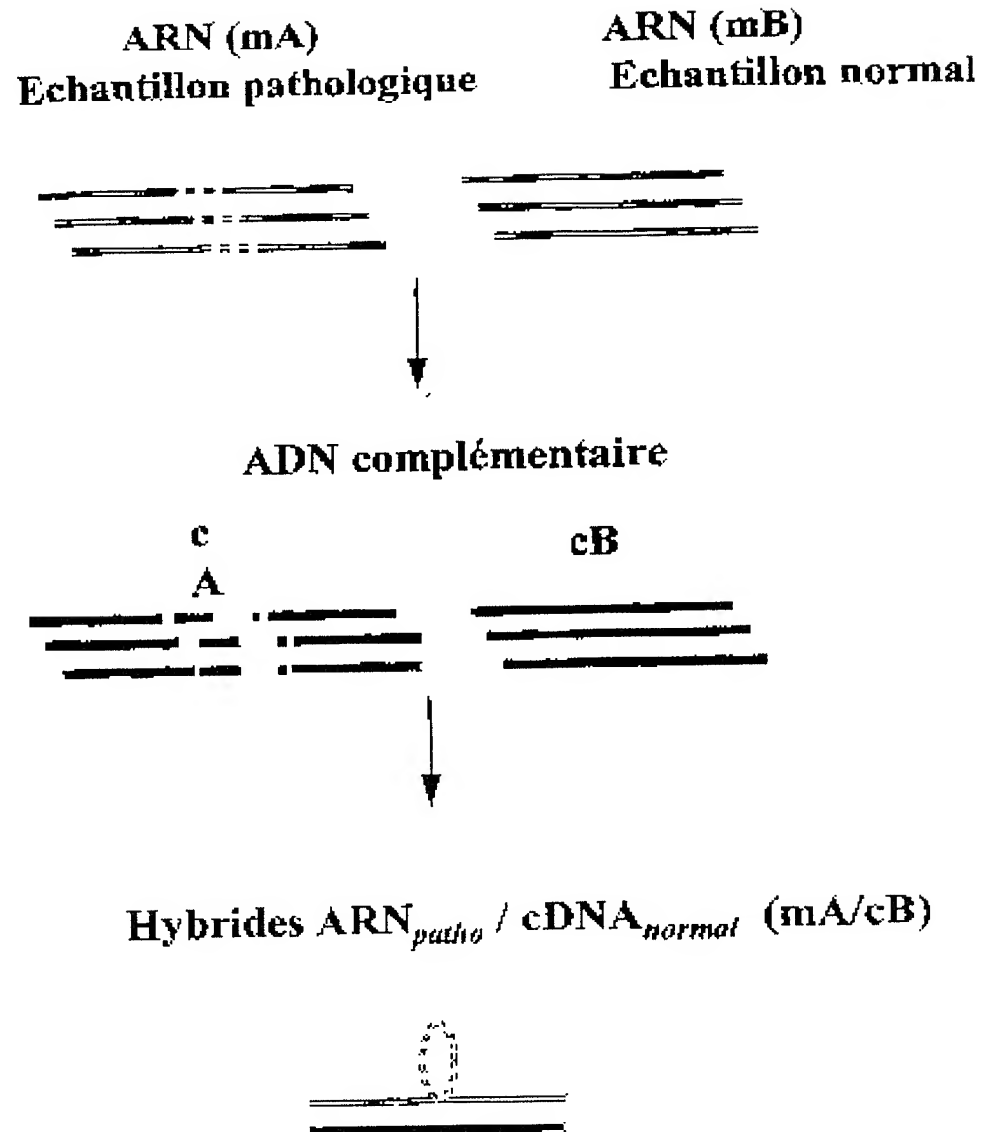
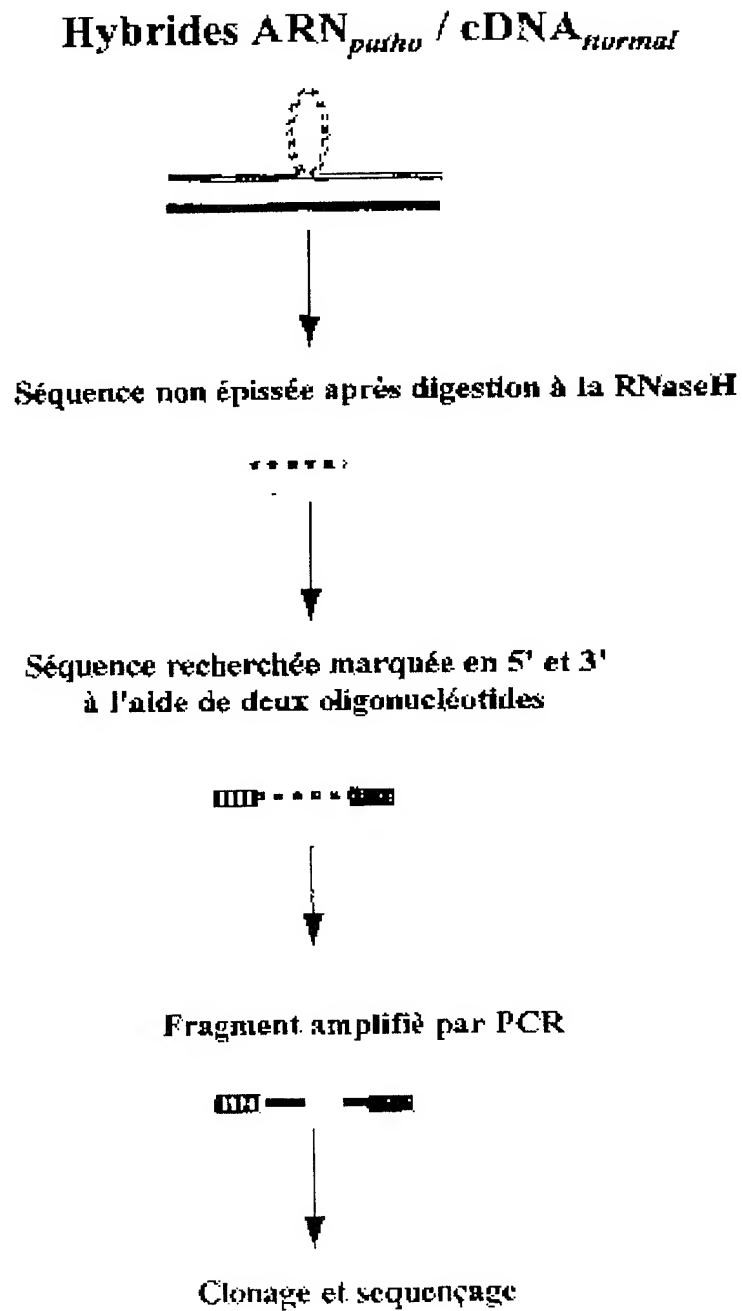


FIGURE 2

FIGURE 3

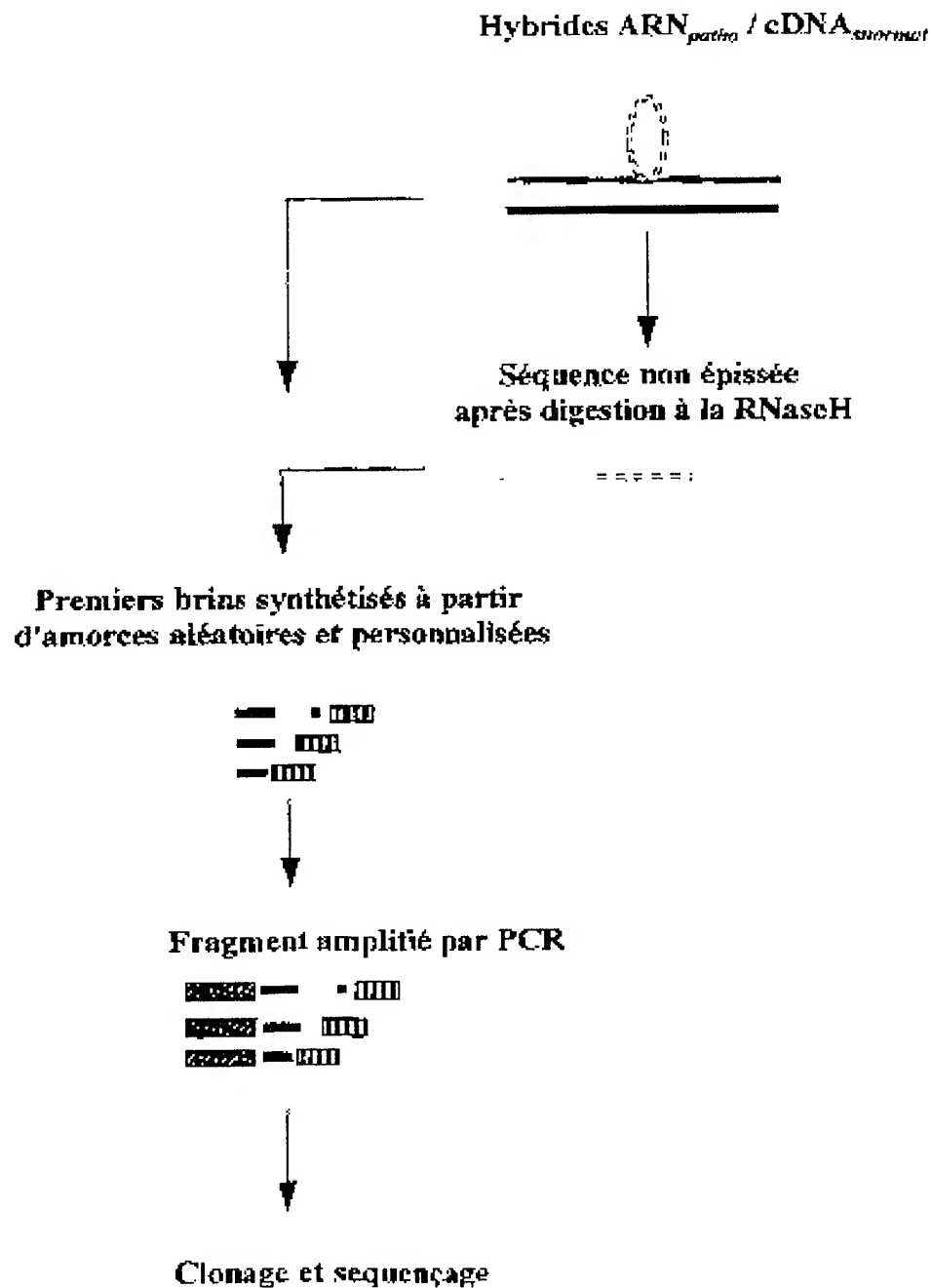


FIGURE 4

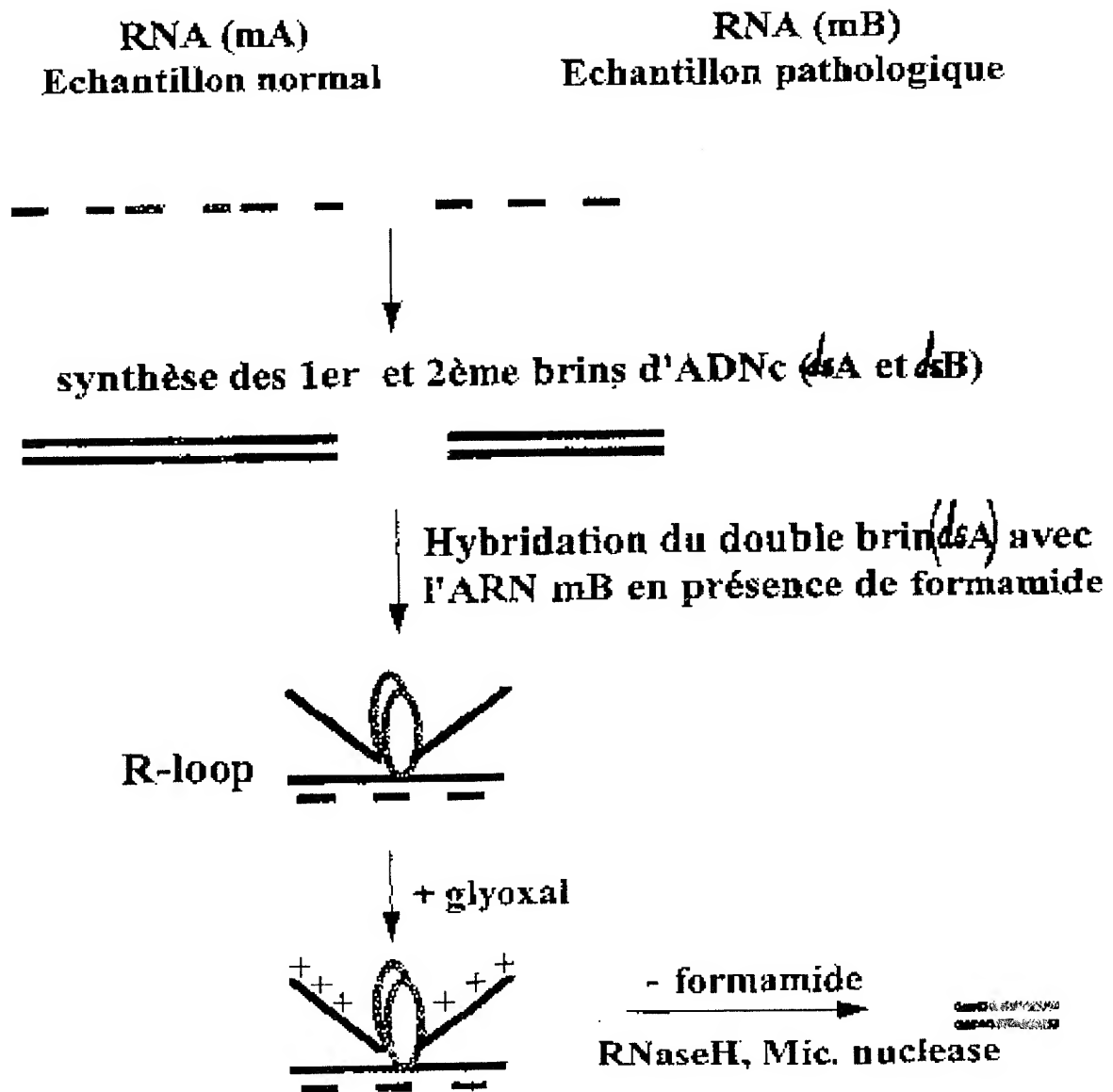


FIGURE 5

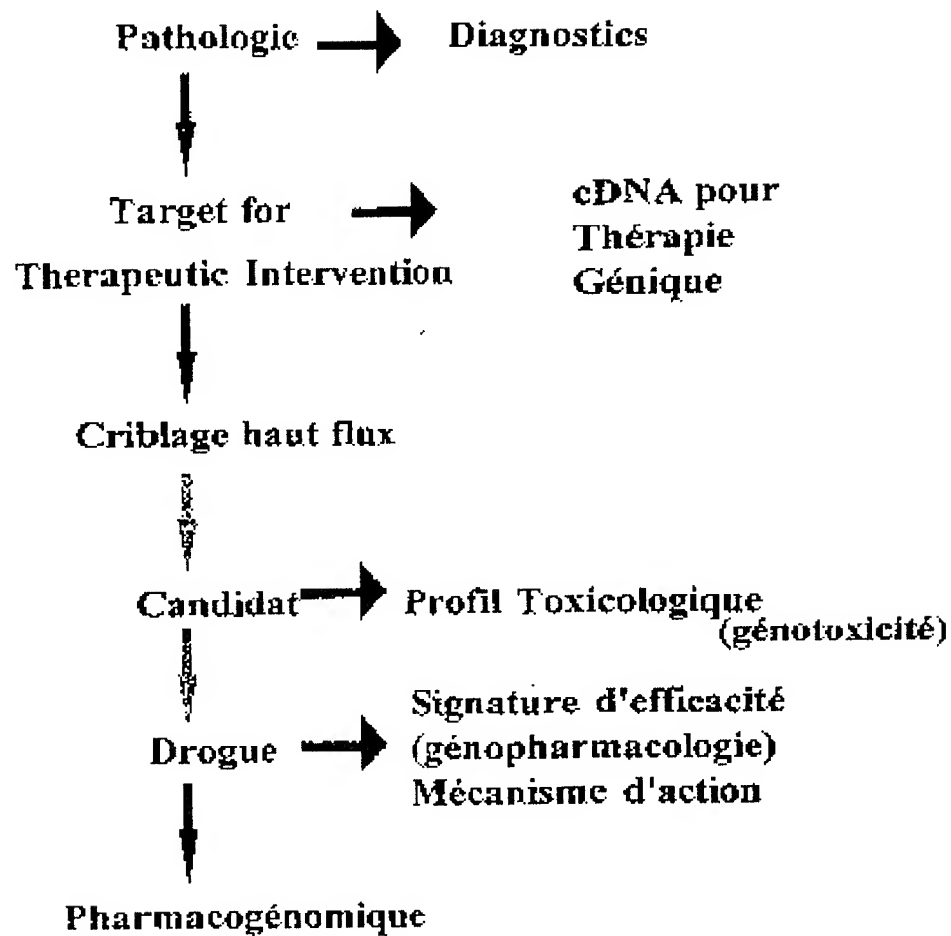


FIGURE 6

9/11

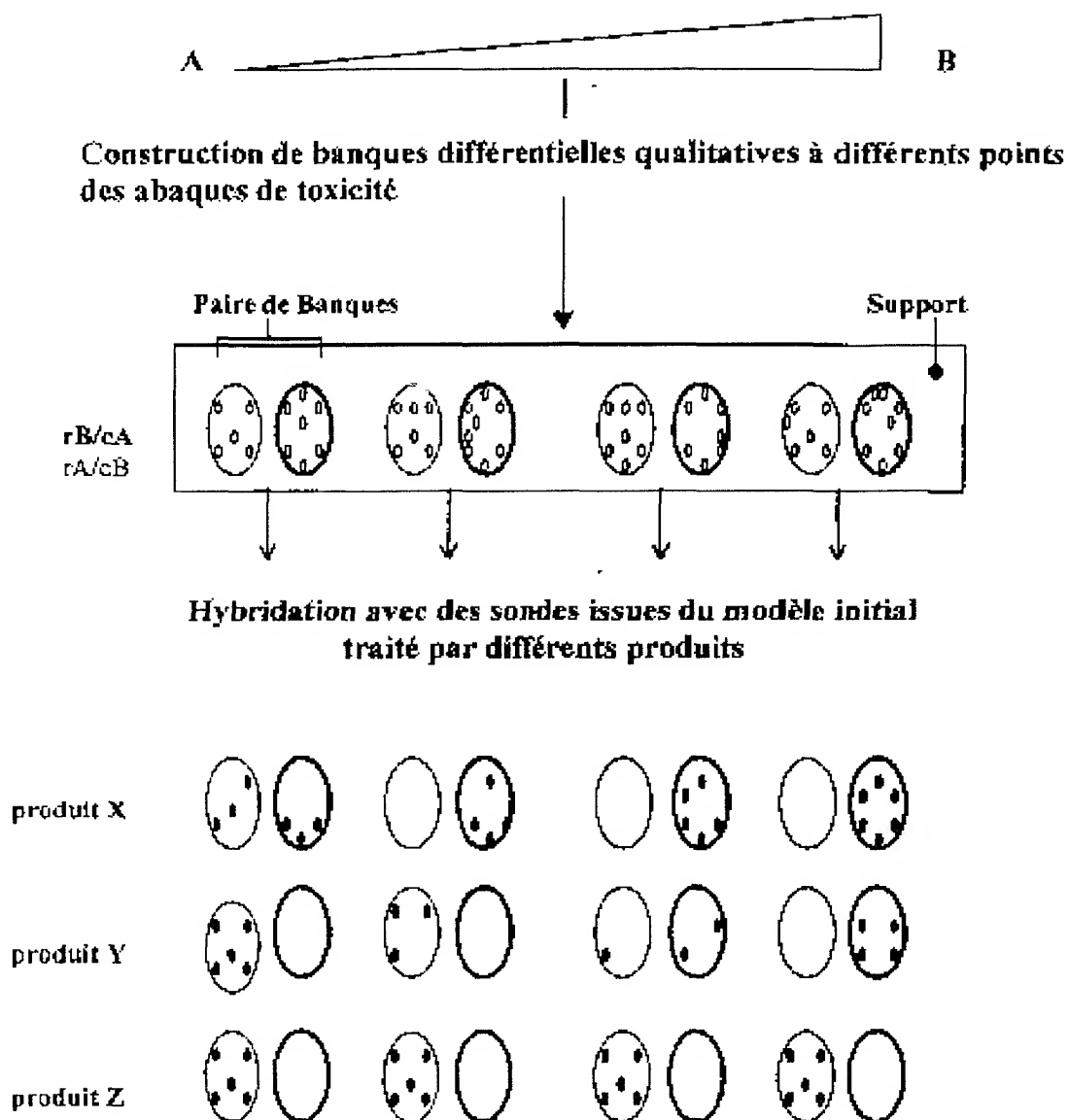


FIGURE 7

10/11

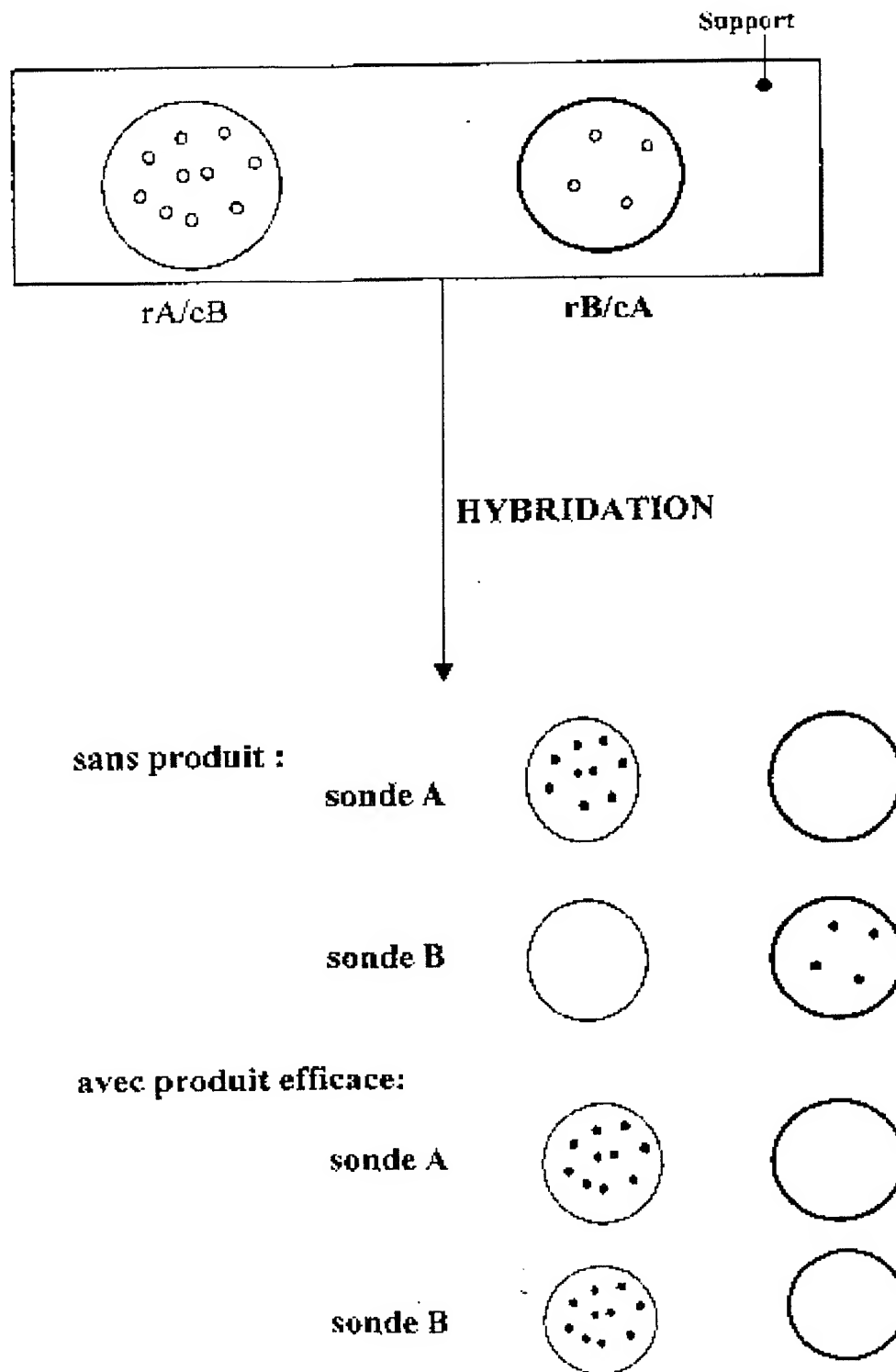


FIGURE 8

2775984

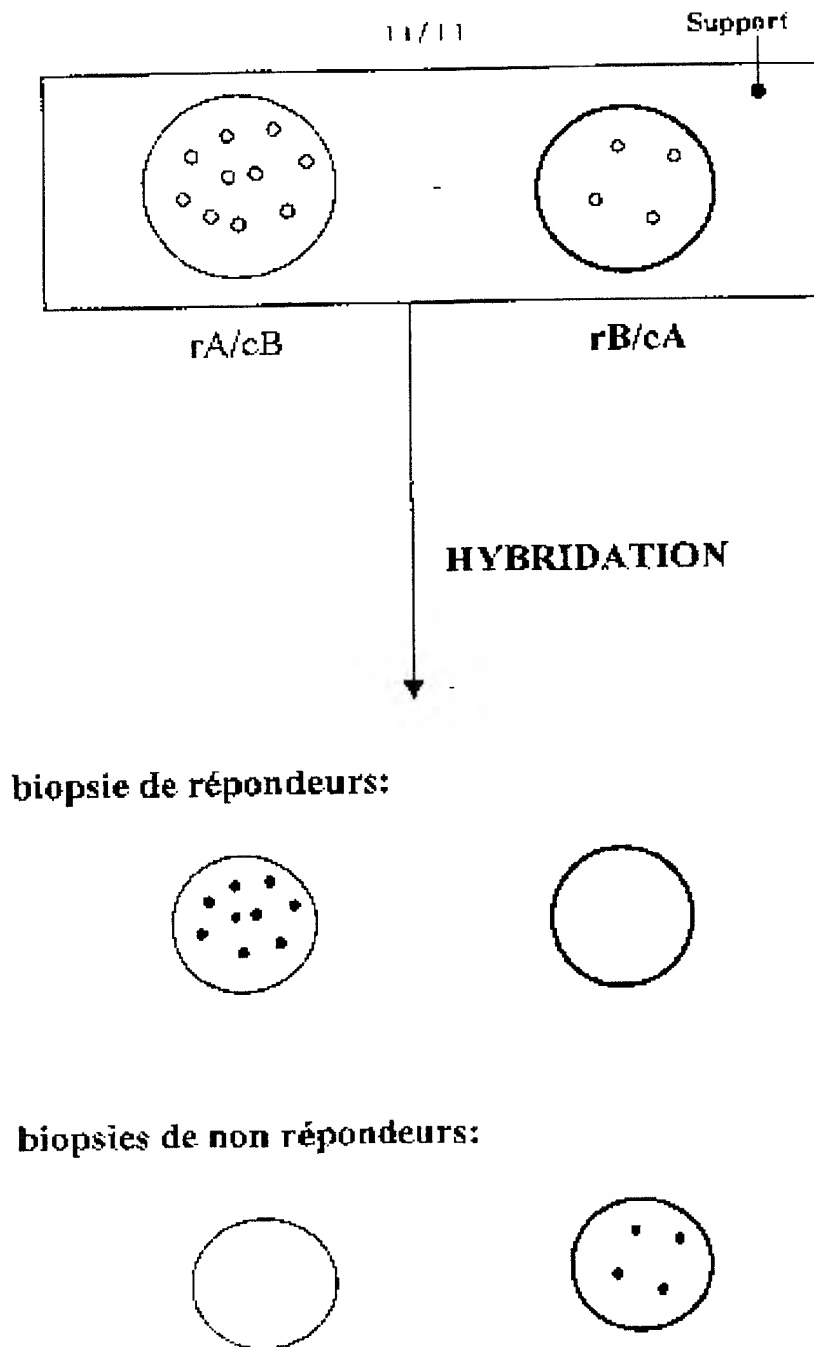


FIGURE 9.